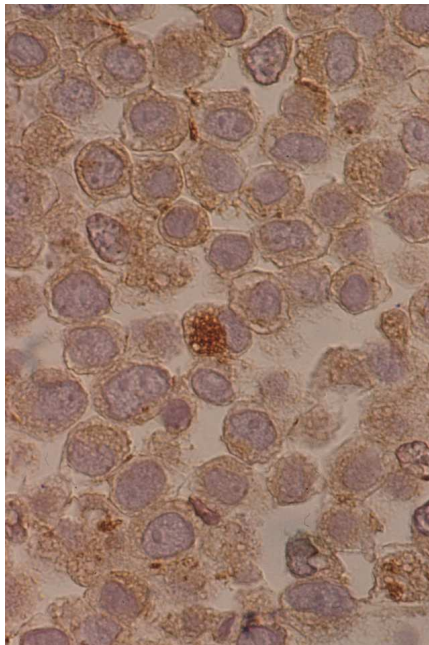


Experimentelle Infektion von juvenilen *Boa constrictor* mit einem Orthoreovirusisolat



INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich
Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Sabina Schragen

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Manfred Reinacher

**Experimentelle Infektion von juvenilen *Boa constrictor* mit
einem Orthoreovirusisolat**

INAUGURAL DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet. beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Sabina Schragen
Tierärztin aus Neunkirchen-Seelscheid

Giessen, 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. M. Reinacher

Prof. Dr. E. F. Kaleta

Tag der Disputation: 07.06.2006

Zwei Dinge sollten Kinder von ihren Eltern bekommen:

Wurzel und Flügel.

Johann Wolfgang von Goethe

Meinen Eltern,

in Liebe und Dankbarkeit

3.1.7.2 Vorbehandlung zum Nachweis von Orthoreovirus IBD26/00-, Vimentin-, Aktin-, Desmin- und Neurofilament-Antigen.....	48
3.1.7.3 Nachweis von Orthoreovirus IBD26/00	48
3.1.7.4 Nachweis von Vimentin, Aktin, Desmin und Neurofilament	49
3.1.7.5 Nachweis von Zytokeratin.....	49
3.1.7.6 Nachbehandlung und Eindecken der Schnitte.....	50
3.1.8 Immunhistologischer Nachweis von Reovirusantigen im Organschnitt.....	50
3.1.9 Negative staining der Kotproben	51
3.1.9.1 Durchführung.....	51
3.1.9.2 Herstellung der Trägerfolien für das negative staining.....	52
3.1.9.3 Material	53
3.1.10 Probennahme für die bakteriologische Untersuchung:	53
3.1.11 Probennahme für die parasitologische Untersuchung	54
3.2 Ergebnisse.....	55
3.2.1 Intravitale Veränderungen	56
3.2.2 Pathohistologische Befunde	56
3.2.3 Virusisolierung und -charakterisierung.....	60
3.2.3.1 Chloroformbehandlung der isolierten Viren	63
3.2.3.2 RNS-Auftrennung mittels der PAGE	63
3.2.3.3 Histologische Untersuchung infizierter Zellkulturen	64
3.2.3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung infizierter Zellkulturen.....	66
3.2.4 Immunhistologische Untersuchung infizierter Zellkulturen.....	67
3.2.4.1 Immunhistologischer Nachweis von Reovirusantigen in infizierten Zellkulturen	67
3.2.4.2 Immunhistologischer Nachweis von Zytokeratin.....	69
3.2.4.3 Immunhistologischer Nachweis von Vimentin.....	69
3.2.4.4 Immunhistologischer Nachweis von Aktin.....	69
3.2.4.5 Immunhistologischer Nachweis von Desmin	69
3.2.4.6 Immunhistologischer Nachweis von Neurofilament	70
3.2.5 Immunhistologischer Nachweis von Reovirusantigen im Organschnitt.....	70
3.2.6 Negative staining der Kotproben	70
3.2.7 Zusammenfassung der virologischen Befunde.....	71
3.2.8 Bakteriologische Untersuchung	72
3.2.9 Parasitologische Untersuchung	74
4. Diskussion	76
5. Zusammenfassung.....	86
5.1 Summary	88
6. Lösungen, Puffer und Bezugsquellen.....	90
6.1 Lösungen für die Zellkultur	90
6.1.1 Dulbecco Phosphat-Puffer (DPB)	90
6.1.2 Basal Medium mit Earls Salzen (BME)	91
6.1.3 Trypsinlösung	91
6.2 Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	92
6.2.1 Beladungs-Lösung.....	92
6.2.2 Elektrodenpuffer	92
6.2.3 Trennpuffer	92
6.3 Lösungen für die histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung	93
6.3.1 Cacodylatpuffer-Lösung.....	93
6.3.2 Cacodylatgepuffertes Formalin.....	93

6.3.3 Cacodylatgepuffertes Glutaraldehyd.....	93
6.4 Lösungen für die immunhistologische Untersuchung	94
6.4.1 Imidazol/HCl-Puffer 0,1 molar (pH 7,1).....	94
6.4.2 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	94
6.4.3 Trisgepufferte Salzlösung (TBS).....	94
6.4.4 Zitratpuffer (pH 6,0)	94
7. Literaturverzeichnis	95
8. Anhang	104
8.1 Gewichtsentwicklung der Tiere.....	104
8.2 Tierdaten zum Zeitpunkt der Sektion.....	105
8.3 Ergebnis der histologischen Untersuchung	106
8.3.1 Magen-Darm-Trakt	106
8.3.2 Pankreas	109
8.3.3 Leber	111
8.3.4 Milz	113
8.3.5 Thymus.....	115
8.3.6 GALT	117
8.3.7 Respirationstrakt.....	119
8.3.8 Knochenmark	121
8.3.9 Niere	122
8.3.10 Gehirn.....	126
8.3.11 Herz	126
8.4 Ergebniss der bakteriologischen Untersuchung	127
8.5 Ergebnisse der parasitologischen Kotuntersuchung.....	134
9. Liste der verwendeten Abkürzungen	135
10. Abbildungsverzeichnis.....	138
11. Verzeichnis der Tabellen	138
12. Verzeichnis der Grafiken	139
13. Danksagung	140

1. Einleitung

Bei der stetig wachsenden Zahl der reptilienhaltenden Haushalte wird in der tierärztlichen Praxis immer deutlicher, wie wenig über diese Tiere und ihre Krankheiten bekannt ist.

Da in dieser Tierklasse viele seltene und von der "Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora" (CITES) geschützte Arten vorkommen, sollte Tierärzten die Bedeutung der artgerechten gesundheitlichen Versorgung dieser bis jetzt noch unzureichend erforschten Tiergruppe ein Anliegen sein. Die Behandlung erkrankter Reptilien ist häufig langwierig und schwierig bis unmöglich. So sollte das Augenmerk der Tierhalter, der Tierärzte und der Forschung auf der Prophylaxe ruhen.

Da viele der Tiere selten gehalten werden und/ oder vom Aussterben bedroht sind, findet ein reger Handel und Tausch zwischen Züchtern statt, um eine möglichst breite genetische Basis zu erhalten. Erkrankungen mit einer langen Inkubationszeit können unter solchen Bedingungen ein großes Problem sein. Eine allgemein als ausreichend erachtete Quarantänezeit kann bei dieser Art einer Infektionserkrankung nicht ausreichend sein. Ein weiteres Problem besteht darin, dass aufgrund der langen Inkubationszeit der Tierhalter nicht mehr nachvollziehen kann, durch welches Tier die Erkrankung in den Bestand gelangte. Die Übertragungswege bleiben auf diese Weise lange ungeklärt.

Eine Früherkennungsmöglichkeit z.B. durch serologische Tests oder Antigen-Nachweise ist in solchen Fällen von enormer Bedeutung. So kann man in der Quarantänezeit die Tiere auf schon bekannte Krankheiten untersuchen und bereits infizierte, aber noch nicht erkrankte Tiere frühzeitig erkennen. Um solche diagnostischen Mittel zu erforschen, bedarf es einer genauen Kenntnis des Erregers. In dieser Dissertation wurde die Pathogenität eines aus einer euthanasierten Schlange isolierten Orthoreovirus untersucht. Das Tier stammt aus einer größeren privaten Haltung. Bei mehreren Tieren dieses Bestandes, einschließlich der Mutter des Tieres und eines Großteils der Geschwistertiere, wurde die Diagnose der Einschlusskörperchenkrankung (IBD) der Riesenschlangen gestellt. Das isolierte Virus wurde in dieser Arbeit charakterisiert und seine Pathogenität für juvenile Abgottschlangen (*Boa constrictor*) und in Zellkulturen bestimmt.

2. Literaturübersicht

2.1 Reoviridae

Bei der Familie der Reoviridae handelt es sich um unbehüllte, 60-80 nm große, sphärische Doppelstrang-RNS-Viren. Die innere Schale ist bei fast allen Genera dieser Familie 50-65 nm groß und hat eine ikosaedrische Symmetrie, um diese innere Schale liegen noch 1-2 weitere Kapsidhüllen.

Zurzeit gehören in die Familie der *Reoviridae* 12 Genera:

1. *Aquareovirus*
2. *Coltivirus*
3. *Cypovirus*
4. *Fijivirus*
5. *Idnoreovirus*
6. *Mycoreovirus*
7. *Orbivirus*
8. *Orthoreovirus*
9. *Oryzavirus*
10. *Phytoreovirus*
11. *Rotavirus*
12. *Seadornavirus*

(CHAPPELL et al., 2005).

Die in der Medizin bedeutungsvollen Reoviren gehören zu den Rotaviren, Orbiviren, Orthoreoviren und Coltiviren.

Orbiviren sind Viren, die nach einer obligaten Vermehrung im Arthropoden-Zwischenwirt den Säugetierwirt befallen (Arboviren).

Das *Bluetongue Virus* führt bei Schafen, Rindern und Wildwiederkäuern zur anzeigepflichtigen Blauzungenerkrankung. Nach einer primären Vermehrung im Lymphgewebe kommt es zur Virämie, wobei die Affinität zu den Endothelien kleiner Blutgefäße und die Zerstörung dieser zu den klinischen Symptomen führt. Der Krankheitsverlauf wird in zwei Verlaufsformen eingeteilt. Der akute Verlauf führt in

den meisten Fällen innerhalb einer Woche zum Tode der Tiere. Aufgrund der Gefäßschädigung kommt es zu Hyperämie der oralen und nasalen Schleimhäute, zu Lippen und Zungenödemen sowie in seltenen Fällen zur Blaufärbung der Zunge infolge der entstehenden Zyanose. Aufgrund schmerzhafter degenerativer Veränderungen der Muskulatur lahmen die Tiere. Bei Jungtieren wird häufig auch eine Diarrhö beobachtet.

Eine bei Weißwedelhirschen ähnliche verlaufende Krankheit löst das *Epizootic Hemorrhagic Disease Virus* aus. Beim Weißwedelhirsch verläuft die Krankheit mit einer hohen Letalität. Rinder und Schafe sind auch empfänglich und scheinen als Reservoir zu dienen, weswegen im Jahr 2000 die Anzeigepflicht für diese Erkrankung eingeführt wurde.

Das *Ibaraki Virus*, ebenfalls zum Genus der Orbiviren gehörend, löst beim Rind die meist mild verlaufende Ibaraki-Krankheit aus.

Das *afrikanische Pferdepest-Virus* ist seit über zweihundert Jahren in Südafrika bekannt. Es führt endemisch immer wieder zu Ausbrüchen südlich der Sahara, von 1987-1990 war es auch auf der Iberischen Halbinsel endemisch. Ein Ausbruch im mittleren Osten und Indien führte zum Tode von 300000 Pferden, Eseln und Mauleseln. Da es eine gut schützende Vakzine gibt, ist die Zahl der Erkrankungen in den letzten Jahren stark zurückgegangen. Vermutlich über latent infizierte Zebras kam das Virus nach Spanien und Portugal. Aber auch mitgebrachte, infizierte *Culicoides*-Mücken können zum Auftreten der in Deutschland anzeigepflichtigen Erkrankung führen. Der Vermehrungsmodus des Virus im infizierten Körper ist dem der Blauzungkrankheit sehr ähnlich.

Ein weiteres Genus der Familie *Reoviridae* stellen die **Rotaviren** da. Sie führen bei vielen jungen Säugetieren zu Durchfällen. Bei Kälbern, Ferkeln und Säuglingen unter sechs Wochen kann es zu ausgeprägten Symptomen bis hin zu Todesfällen kommen. Aber auch bei anderen Tierarten kann es durch Sekundärinfektionen mit Coronaviren, *E. coli* oder Kryptosporidien zu schweren bis tödlichen Verlaufsformen kommen. Das Virus vermehrt sich nach oraler Aufnahme in den differenzierten Epithelzellen des kaudalen Jejunums und führt so zur Zottenatrophie und zum Malabsorptionssyndrom.

Das *Colorado tick fever Virus* aus dem Genus der **Coltiviren** wird von der Zecke *Dermacentor andersoni* übertragen. Als Reservoir dienen verschiedene Nagetiere, welche eine bis zu fünf Monate andauernde Virämie haben können. Nach 5-6 Tagen

führt das Virus beim Menschen zu einer fiebrigen und schmerzhaften Allgemeinerkrankung.

Orthoreoviren wurden bei verschiedenen respiratorischen und intestinalen Erkrankungen isoliert. Beim Rind kann bei einer Mischinfektion mit Parainfluenza-Virus 3 die *enzootische Bronchopneumonie* ausgelöst werden. An dem vielfältigen Bild des kaninen *Zwingerhustenkomplexes* ist neben einer Vielzahl anderer Pathogene auch ein Orthoreovirus beteiligt.

Auch aus schwer erkrankten und verendeten Tieren wurden Orthoreoviren isoliert. So wurde in Texas ein Orthoreovirus als Erreger einer tödlich verlaufenden *Enzephalitis bei Pavianen* gefunden (LELAND et al., 2000).

In der Geflügelhaltung führen die durch Orthoreoviren hervorgerufene *Virusarthritis* und das *Malabsorptionssyndrom* zu teilweise schweren Verlusten (GUY et al., 1988; RUFF und ROSENBERGER, 1984; SONGSERM et al., 2002).

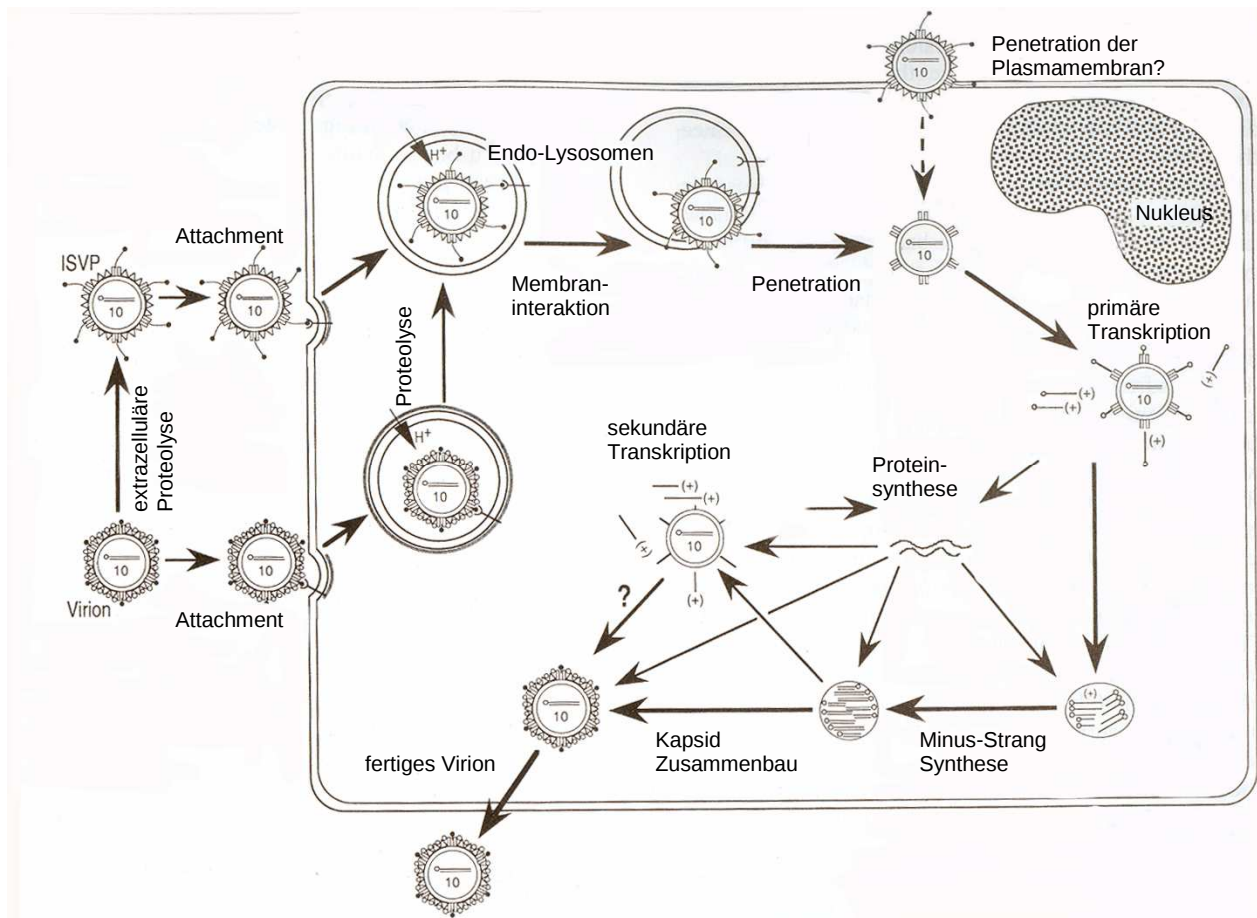
Das einzige bis heute untersuchte Orthoreovirus bei Reptilien, für welches die Kochschen Postulate erfüllt wurden, ist das *Elaphe Reovirus*. In verschiedenen *Elaphe*-Spezies führt das *Elaphe-Reovirus* zu einer zum Teil tödlich verlaufenden interstitiellen Pneumonie (LAMIRANDE et al., 1999).

Bis auf zwei Ausnahmen, das Nelson-Bay-Reovirus (NBV) und das *Baboon-Reovirus* (BRV), gehören die Orthoreoviren der Säugetiere zu den nicht synzytienbildenden Orthoreoviren und werden der Einfachheit halber in der Literatur allgemein nur als Reoviren angesprochen (TYLER und OLDSTONE, 1998).

2.1.1 Replikation

Das doppelsträngige RNS Virus hat einen relativ einfachen Vermehrungszyklus. Die Einschleusung erfolgt über Rezeptorvermittelte Endozytose (STRONG et al., 1993).

Abb 1: Schemazeichnung einer Orthoreovirus-infizierte Zelle



Modifiziert nach TYLER, 2001

Diese schematische Darstellung des Reovirusreplikationszyklus veranschaulicht die Virusvermehrung in infizierten Zellen.

Sofern das Virion nicht durch extrazelluläre proteolytische Zersetzung sein äußeres Kapsid verloren hat, geschieht dies intrazytoplasmatisch in Endo- Lysosomen. Im Virion enthaltene RNS-Polymerase spaltet die doppelsträngigen RNS-Segmente und führt zur Bildung von plus Strang RNS, welche mit Hilfe der zellulären Ribosomen in Proteine translatiert werden kann. Diese Proteine sammeln sich und bilden die neuen Virionen.

2.2.1 Orthoreoviren

Die Eingruppierung der Reoviren in das Genus der Orthoreoviren basiert auf folgenden Charakteristika:

1. Größe und Morphologie des Virion
2. Zahl und Größe der Gensegmente (10)
3. Nukleotidsequenzen
4. Zahl und Anordnung der Strukturproteine
5. serologische Reaktionen

Das Genus der Orthoreoviren wird in fünf Spezies eingeteilt. Die erste Spezies wird von den nicht zur Zellfusion führenden Reoviren der Säugetiere (MRV) gestellt. Diese werden in Typ 1 Lang (T1L), Typ 2 Jones (T2J), Typ 3 Dearing (T3D) und Ndelle Reovirus unterteilt.

Die aviären Reoviren (ARV) stellen die Zweite große Gruppen dar, sie sind genetisch untereinander nicht so eng verwandt wie die MRV. Durch Neutralisationstests werden die aviären Orthoreoviren in elf Serogruppen eingeteilt, die aber untereinander noch stark variieren (HUPPERT, 1996).

Das Isolat aus dem australischen Flughund (NBV), eines in der Zellkultur ebenso wie die ARV zur Synzytienbildung führenden Virus, wird als eigenständig angesehen. Ein ebenfalls zur Zellfusion führendes Säugetier-Reovirus aus einer Pavian Tierversuchsgruppe (BRV) wird ebenfalls als separat angesehen. Ebenso wie die ARV und das NBV führt das BRV in der Zellkultur zur Bildung von Synzytien.

Die Eigenschaft, Synzytien zu bilden, ist für unbehüllte Viren ungewöhnlich, da ihnen das bei behüllten Viren dafür verantwortliche Glykoprotein fehlt.

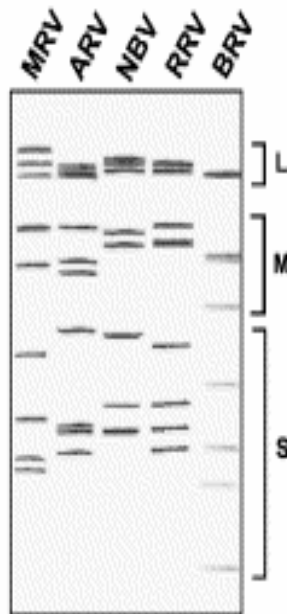
Nach Endozytose der Reoviruspartikel werden in die Plasmamembran der infizierten Zelle Glykoproteine eingebaut, welche zur Fusion der benachbarten Zellen führen (DUNCAN et al. 1996; NI und RAMIG, 1993; SHMULEVITZ und DUNCAN, 2000).

Als fünfte in dieses Genus gehörende Spezies schlagen DUNCAN et al. (2004) die Reptilien-Reoviren (RRV) vor. Im Jahr 2005 wurde dieser Vorschlag vom internationalen Komitee für die Taxonomie von Viren berücksichtigt, die RRV bilden nun die fünfte Spezies im Genus der Orthoreoviren (CHAPPELL et al., 2005).

Die Arbeitsgruppe um DUNCAN untersuchten die Abfolge des polycistronischen S1 Gensegmentes und die Aminosäureverhältnisse der codierten Proteine.

Auf einer SDS-PAGE stellten DUNCAN et al. (2004) die aufgetrennten Gensegmente wie folgt dar.

Abb. 2: Vergleichende Orthoreovirus-Gensegmente



MRV: Säugetier-Reovirus, T1L; ARV: aviäres Reovirus, Stamm 176; NBV: Nelson Bay Virus; RRV: Reptilien-Reovirus (AHNE et al., 1987); BRV: Baboon-Reovirus; L: Klasse der großen Gensegmente; M: Klasse der mittleren Gensegmente; S: Klasse der kleinen Gensegmente (DUNCAN et al., 2004).

Den aviären (HUPPERT, 1996; HUTHER, 1996; SIEVERS-KRUSE, 1992) sowie den Reptilien-Reoviren (AHNE et al., 1987; BLAHAK et al., 1995; LAMIRANDE, 1999; OTT, 2000; VIELER et al., 1994) fehlt die Fähigkeit zur Hämagglutination.

BLAHAK et al. (1995) kommen nach der Untersuchung sechs verschiedener Reptilien-Reoviren zu dem Schluss, dass die Isolate in zwei Serogruppen eingeteilt werden können. Jedes dieser Isolate zeigt ein anderes Wanderungsmuster in der PAGE.

Bei verschiedenen Reoviren sind filamentöse Proteine am äußeren Kapsid festgestellt worden, sie werden von dem Strukturprotein $\sigma 1$ gebildet (DRYDEN et al., 1993). Das $\sigma 1$ Strukturprotein hat eine Aufteilung in Kopf und Schwanz. Am Kopfbereich sind zwei Rezeptorenbindungsstellen und am Schwanz eine Sialinsäure bindende.

Der Kopfbereich bindet an Rezeptoren der Zelle, an das JAM (junction Adhäsionsmolekül), ein Serotyp-abhängiger Reovirusrezeptor. JAM dient bei Serotyp 1 und 3 der Säugetier-Reoviren als Rezeptor. Da beide Serotypen aber einen unterschiedlichen Tropismus haben, wird spekuliert, dass Kohlenhydrate oder Polysialinsäure als Corezeptoren dienen.

In vivo wurden diese JAM's an vielen Zellarten gefunden, die bekannt sind als Zielzellen von Reoviren, einschließlich intestinalen Epithelien, Lungenepithelien und Leukozyten.

Beide Bindungsstellen, JAM und Sialinsäure sind für die erfolgreiche Infektion der Zelle von Bedeutung. Nur wenn beide Stellen genutzt wurden wird NF- κ B aktiviert, das die Apoptose der Zelle auslöst (BARTON et al., 2001; CONNOLLY et al., 2001; CONNOLLY et al., 2000).

Säugetierreoviren haben zwei gut erforschte infektiöse, subvirale Partikel. Ihnen fehlt durch proteolytische Zersetzung das $\sigma 3$ -Protein sowie das Protein $\mu 1/\mu 1C$. Das Protein $\sigma 1$ zeigt eine weniger kompakte Struktur. Diese subviralen Partikel (ISVPs) sind unvermindert infektiös. STURZENBECKER et al. (1987) konnten mittels der Steigerung des pH innerhalb der Lysosomen zeigen, dass diese pH-abhängige proteolytische Zersetzung der Viruspartikel essentiell für den Infektionszyklus ist.

DUNCAN et al. (1996) konnten mit ihren Forschungen feststellen, dass durch die Hemmung des intrazellulären Vesikeltransportes das Bilden der Synzytien in mit aviären Orthoreoviren infizierten Zellkulturen ausbleibt. Diese Forschungsgruppe konnte durch die nicht erfolgte Hemmung der Synzytienbildung mit Tunicamycin nachweisen, dass bei der Synzytienbildung keine N-Glykolysierung beteiligt ist. Durch die Reduktion der Synzytienbildung im Vergleich zu Kontrollzellkulturen durch 2-Deoxyglucose konnte ein Zusammenhang mit der O-Glykolisierung gezeigt werden. Viele der aviären Reovirusproteine sind O-glykolisiert.

Brefeldin A wurde von DUNCAN et al. (1996) als spezifischer Vesikeltransport-Inhibitor bei einer Wachtel-Fibrosarkom-Zelllinie (QT6) verwendet. Es konnte veranschaulicht werden, dass durch die Hemmung des Vesikeltransportes keine Synzytienformierung nach der Infektion mit dem aviären Reovirusstamm 176 stattfand. Die Virusvermehrung zeigte eine geringgradige Einbuße im Vergleich zur unbehandelten QT6- Zellkultur. Somit konnten DUNCAN et al. (1996) zeigen, dass die Synzytienbildung und die Virusvermehrung unabhängige Ereignisse sind.

Versuche, die verwandtschaftlichen Beziehungen der aviären und der zur Zellfusion führenden Säugetier-Reoviren herauszufinden, brachten erstaunliche Ergebnisse hervor. Die aviären Reoviren scheinen einen gemeinsamen Vorfahren mit den Nelson-Bay-Virus zu teilen (DUNCAN et al., 2004).

Danach sind die zellfusionierenden Säugetier-Reoviren nicht durch die Überschreitung der Speziesbarriere aus aviären Reoviren entstanden, sondern haben alle eine voneinander getrennte phylogenetische Entwicklung.

Vor dieser Untersuchung wurde vermutet, dass es zu einem Genreassortment zwischen einem Säugetier-Reovirus mit einem aviären Orthoreovirus gekommen ist und so die Information für das zur Zellfusion führenden Proteins weitergegeben wurde.

Die bisher entdeckten Virusproteine werden den folgenden Gensegmenten zugeordnet und ihnen sind folgende Funktionen zugeschrieben worden:

Tab. 1: Gensegmente, translatierte Proteine und deren Funktion

Gen-segment	Größe	translatierte Proteine	Funktion (soweit bekannt)	Literaturstelle
L1	3800-3900 Nukleotide	$\lambda 3$, 142 kD	transkribiert die viralen Gensegmente in mRNS	DRYDEN et al., 1993
L2	3800-3900 Nukleotide	$\lambda 2$, 144 kD	setzt möglicherweise 5' cap an mRNS, vielleicht Kanal für mRNS	DRYDEN et al., 1993
			katalysiert mRNS-capping	BUJNICKI und RYCHLEWSKI, 2001
		$\lambda 2$	Kristallisation von T3D im Zytoplasma	COOMBS et al., 1990
		$\lambda 2$, 150 kD	nicht bekannt	JOKLIK, 1981
L3	3800-3900 Nukleotide	$\lambda 1$, 137 kD	nicht bekannt	DRYDEN et al., 1993

Legende siehe Seite 11

Tab. 1 (Fortsetzung):

Gen-segment	Größe	translatierte Proteine	Funktion (soweit bekannt)	Literaturstelle
M1	2200-2300 Nucleotide	$\mu 2$, 83 kD	nicht bekannt	DRYDEN et al., 1993; WIENER et al., 1988
			involviert in der negativ- und positiv-RNS-Synthese	BRENTANO, et al., 1998
			beteiligt an der Einschlusskörperbildung	BECKER et al., 2001; BROERING et al., 2002; MBISA et al., 2000
			notwendig für die Replikation	ZOU und BROWN, 1992
M2	2200-2300 Nukleotide	$\mu 1$, 76 kD ($\mu 1/\mu 1C$)	Membranpenetration	DRYDEN et al., 1993
		$\mu 1$, 80 kD	nicht bekannt	JOKLIK, 1981
M3	2200-2300 Nukleotide	μNS	nicht bekannt	BROERING et al., 2002
		μNS , 75 kD	nicht bekannt	JOKLIK, 1981
S1	1200-1400 Nukleotide	$\sigma 1$	Protein für die Zellbindung	DUNCAN et al., 2004
			Hämagglutinin der MRV	KAUFFMAN et al., 1983
		$\sigma 3$	Antigen	Ni und KEMP, 1995
			unterschiedlich bei T1L und T3D, wichtig für Tropismus, da für Rezeptorerkennung	DRYDEN et al., 1993

Legende siehe Seite 11

Tab.1 (Fortsetzung):

Gen-segment	Größe	translatierte Proteine	Funktion (soweit bekannt)	Literaturstelle
		σC , 35 kD	vermutlich beteiligt an der Zellfusion bei RRV	CONCORAN und DUNCAN, 2004
		p14, 14 kD	vermutlich beteiligt an der Zellfusion bei RRV	CONCORAN und DUNCAN, 2004
S2	1200-1400 Nukleotide	$\sigma 2$, 47 kD	nicht bekannt	DRYDEN et al., 1993
		$\sigma 2$, 38 kD	nicht bekannt	JOKLIK, 1981
S3	1200-1400 Nukleotide	σNS	nicht bekannt	BROERING et al., 2002
		σNS , 75 kD	nicht bekannt	JOKLIK, 1981
S4	1200-1400 Nukleotide	$\sigma 3$, 41 kD	wichtig für richtige Anordnung von $\mu 1$ und für die Stabilisierung bei unwirtlichen Verhältnissen	DRYDEN et al., 1993
		$\sigma 3$, 34 kD	nicht bekannt	JOKLIK, 1981

L: große Gensegmente; M: mittelgroße Gensegmente; S: kleine Gensegmente; kD: Kilodalton; λ : große Proteine; μ : mittelgroße Proteine; σ : kleine Proteine

Da die Gensegmente S4 und S1 bi- bzw. polyzistronisch sind und somit zwei beziehungsweise mehr open-reading-frames besitzen, werden hier verschiedene Proteine synthetisiert, die zwischen den Viren variieren (DUNCAN et al., 2004).

Kommt es zur Doppelinfektion einer Zelle mit Viren verschiedener Serogruppen, können einzelne Gensegmente zwischen ihnen ausgetauscht werden. Es besteht bei einer Doppelinfektion mit zwei, jeweils 10 Gensegmente enthaltenden Orthoreoviren, eine Varianzmöglichkeit von $2^{10}-2$, jedoch sind nicht alle dieser Varianten vermehrungsfähig. Es konnte noch kein Austausch zwischen Viren verschiedener Tierarten nachgewiesen werden (NIBERT und SCHIFF, 2001).

2.2.2 Orthoreoviren in der Zellkultur

Die Reoviren der Säugetiere können die zelluläre DNS Synthese hemmen und zur Apoptose führen. Durch die Herstellung verschiedener Reassortanten aus Reovirus T1L, Typ 3 Abney (T3A) und T3D konnten TYLER et al (1996) ermitteln, dass die Gensegmente S1 und M2 diese Fähigkeit der Viren weitergeben.

Virus-induzierte Apoptosen werden bei Infektionen mit Säugetier-Reoviren häufig in der Zellkultur beobachtet, das Ausmaß der Zelluntergänge ist aber stark vom Virusstamm abhängig (TYLER, 2001).

Verschiedene aviäre Reoviren lösen ebenfalls nach der Infektion verschiedener Zellkulturen den programmierten Zelltod aus. Die Aktivierung dieser zelleigenen Kaskade wird von einem der ersten Schritte nach dem Viruseintritt angeregt (LABRADA et al., 2002).

Die Bildung von intrazytoplasmatischen Einschlüssen in verschiedenen Zellkulturen wurde von ANDERSON (1966); BECKER et al. (2001); BROERING et al. (2002); GOMATOS et al. (1962); RHIM et al. (1962) und anderen beschrieben. Für Säugetier-Reoviren sehr untypisch verhält sich das NBR, in dem es wie aviäre Reoviren in der Zellkultur die Bildung von Synzytien auslöst (WILCOX und COMPANS, 1982). Das ebenfalls zur Zellfusion führende BRV bildet zudem in der Vero-Zellkultur eosinophile intrazytoplasmatische Einschlüsse.

Die große heterogene Gruppe der ARV bildet in den verschiedensten Zellkulturen Synzytien (GRÄBER, 1994; HIERONYMUS et al., 1982; HIERONYMUS et al., 1982b; HUTHER, 1996; MAGEE et al., 1993; SIEVERS-KRUSE, 1992). Es wird auch immer wieder von der Bildung intrazytoplasmatischer Einschlüsse berichtet (GLASS et al., 1972; TAKEHARA et al., 1989).

1989 konnten TAKEHARA et al. aus dem Kot juveniler Japanmöwen (*Larus crassirostris*) ein Reovirus isolieren, das in Hühnerküken-Nieren-Zellkulturen intrazytoplasmatische Einschlüsse induzierte, welche sich mit der Acridin-Orange Färbung gut darstellen ließen.

Auch von einer Vielzahl aus Reptilien isolierter Reoviren wird berichtet, dass sie in der Zellkultur Synzytien verursachen (AHNE et al., 1987; BLAHAK et al., 1995; MARSCHANG, 2000; VIELER et al., 1994). Bei RRV wurde für diese Eigenschaft ein kleines, hydrophobes, basisches Protein ausgemacht (CORCORAN und DUNCAN, 2004).

In einer Vielzahl von Gewebekulturen wurden persistierende Infektionen über Jahre hinweg nachgewiesen. Durch eine hohe Anzahl an Passagen kann der Reovirusstamm T3D in *Spinner adapted mouse L cells* zu einer persistierenden Infektion führen (DERMODY et al., 1993).

In persistent infizierten Mäusefibroblasten-Kulturen (L929) wurden im Laufe der Zeit weniger virale Proteine produziert.

DANIS et al. (1993) gehen davon aus, dass der schnelle zytopathische Effekt bei Reovirusinfektionen in der Zellkultur durch die Hemmung der zelleigenen Proteinsynthese bedingt ist. Es wurde durch Selektion eine persistent infizierte Zellkultur aus Mäuse-Embryo-Fibroblasten etabliert. Auffällig in dieser Zellkulturpopulation war der hohe Level an Doppelstrang-RNS-aktivierter Proteinkinase. Dieses zelluläre Protein wird durch die Bindung an doppelsträngige RNS aktiviert und stimuliert die Interferonausschüttung.

MONTGOMERY et al. (1991) infizierten *Madin Darby canine kidney* (MDCK)-Zellen mit dem Reovirus T1 Lang und konnten den höchsten Virustiter nach zwei Tagen feststellen, nach dieser Zeit blieb der Virusgehalt der Zellkultur bis zum siebten Tag *post infectionem* stabil. In dieser Zeit konnte keine verminderte zelluläre Proteinreplikation beobachtet werden. In den zunächst morphologisch unauffälligen Zellkulturen konnte über ein Jahr ein steigender Virustiter gemessen werden. In der Zeit nach der sechsten Woche *p.i.* änderte sich die typische pflastersteinartige Zellkulturmorphologie in ein fibroblasten-artiges Erscheinungsbild. Die Zellen bildeten Ausläufer und überlappten sich stellenweise. Die persistent infizierten Zellen bildeten keine Tight Junctions und es blieb die Bildung eines nicht näher beschriebenen, Adhäsionsmoleküls aus; die Zellen konnten somit keinen konfluenten Monolayer bilden.

2.2.3 Orthoreoviren als Krankheitserreger

Aufgrund der großen Heterogenität der Orthoreoviren, begründet unter anderem in der segmentierten Genomstruktur, welche den Austausch einzelner Genomsegmente zwischen einzelnen Individuen der Orthoreoviren zulässt (TYLER und OLDSTONE, 1998), ist die Pathogenität der verschiedenen Stämme sehr unterschiedlich und wird von apathogen bis hochpathogen angegeben.

Das Strukturprotein $\sigma 1$ ist das Adhäsionsmolekül der Orthoreoviren und bedingt den Gewebstropismus der verschiedenen Virusstämme. Der globuläre Anteil des $\sigma 1$ -Proteins bindet an den Sialinsäureanteil des *Epidermal Growth Factor*-Rezeptors.

Die große Anzahl der Reovirus-empfindlichen Zellen kann dadurch erklärt werden, dass eine Vielzahl der Zellen sialinisiert ist (STRONG et al., 1993).

Die Bedeutung der Reoviren in der Humanmedizin ist nicht völlig geklärt. Während einige Forscher von einem ubiquitären Keim sprechen (COFFEY et al., 1998; ETOH et al., 2003) wurde von RICHARDSON et al. (1994) eine Korrelation zwischen dem Auftreten von IgM Antikörpern gegen das Reovirus 3 bei Säuglingen und dem Auftreten der extrahepatischen biliären Atresie sowie anderer Lebererkrankungen berichtet. 21-28 % der untersuchten Mütter wiesen IgM Antikörper gegen Reovirus 3 im Blut auf. Es konnte jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Müttern gesunder und erkrankter Kinder festgestellt werden.

Bei der Stuhluntersuchung von 2854 Kindern mit gastrointestinalen Syndromen wurden in Argentinien bei drei Kindern Reoviren nachgewiesen (GIORDANO et al., 2002).

Die Erstbeschreibung eines Reovirus bei Schlangen erfolgte von AHNE et al. (1987). Sie konnten aus den Homogenaten von Niere, Leber und Milz eines moribunden Königspython (*Python regius*) ein Virus isolieren. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der Auftrennung der Gensegmente mittels der PAGE wurde das isolierte Virus der Gattung Orthoreovirus zugewiesen.

LAMIRANDE et al. (1999) isolierten aus einer Blumennatter (*Elaphe moellendorffi*) und einer Schönnatter (*Elaphe taenuris*) ein Reovirus. Die Tiere stammten aus einer Gruppe von frisch aus Asien in die USA importierten Schlangen. In diesem Bestand kam es zu gehäuften Todesfällen ohne vorherige klinische Anzeichen. Bei der pathologischen Untersuchung der Tiere fiel eine subakute interstitielle Pneumonie mit fokaler Epithelhyperplasie auf. Im Lumen der Lungen wurden entzündliche Exsudate und massenhaft Bakterien gefunden. 26 Tage nach der experimentellen trachealen, oralen und nasalen Infektion einer schwarzen Erdnatter (*Elaphe obsoleta obsoleta*) mit dem isolierten Virus wurde diese tot in ihrem Käfig gefunden. Bei der pathologischen Untersuchung fiel eine diffuse subakute interstitielle Pneumonie mit Epithelhyperplasie und Synzytienbildung der Epithelzellen auf. In der Leber gefundene große Nekroseareale wurden einer sekundären Septikämie zugeschrieben.

Eine weitere schwarze Erdnatter wurde mit dem Virusisolat aus der Lunge der ersten experimentell infizierten Schlange infiziert und nach 40 Tagen euthanasiert. Dieses Tier zeigte eine hochgradige proliferative interstitielle Pneumonie. Zusätzlich wurde eine multifokale subakute proliferative Tracheitis diagnostiziert. Aus Leber, Lunge und Splenopankreas konnte das Virus reisoliert werden. Im Lungengewebe dieser Schlange wurden mittels Transmissionselektronenmikroskopie Reoviruspartikel nachgewiesen. Das von LAMIRANDE et al. (1999) *Elaphe-Reovirus* genannte Orthoreovirus ist bislang das einzige Reptilien-Reovirus, welches die Kochschen Postulate erfüllt.

Bei einer an zentralnervösen Störungen leidenden Klapperschlange (*Crotalus viridis*) wurde aus dem Gehirngewebe ein Orthoreovirus (VIELER et al., 1994) isoliert. Das Tier war makroskopisch sowie lichtmikroskopisch ohne besonderen Befund. Lediglich in der Niere konnte eine geringgradige gemischtzellige Infiltration festgestellt werden.

Sechs indische Dornschwanzagamen (*Uromastix hardwickii*) wurden kurz nach dem Import nach Großbritannien plötzlich tot aufgefunden. Die Gruppe bestand aus 50 aus Pakistan exportierten Agamen. Bei allen verstorbenen Tieren konnte ein Fehlen der Fettpolster sowie eine dunkelrote Verfärbung der Lunge festgestellt werden. In Dünndarm, Lunge, Herz und Blut wurde ein Salmonella-ähnliches Bakterium gefunden. In der Leber konnten *Salmonella arizonae* bei der routinemäßigen bakteriologischen Untersuchung nachgewiesen werden. Bei der virologischen Untersuchung von Leber, Milz und Dünndarm wurden Reoviren isoliert (DRURY et al., 2002).

Wie auch schon bei aviären Reoviren spekuliert wurde, kann das Reptilien-Reovirus als primäres immunsuppressives Agens der Salmonellensepsis zu Grunde liegen. Dass Salmonellen aber auch ohne den Nachweis von anderen Pathogenen in Verbindung mit Stress bei Reptilien zu einer Septikämie und zum Tode führen können, ist bekannt (FRYE, 1991).

Neutralisierende Antikörper gegen zwei in Deutschland aus Grünen Leguanen (*Iguana iguana*) isolierten Reoviren (1523/93 und 1118/94) wurden bei klinisch gesunden, wildlebenden Großleguanen auf Utila und Roatan gefunden. Es wurden Kloaken- und Rachentupfer sowie Blutproben von 31 Utila-Leguanen (*Ctenosaura bakeri*), vier schwarzen Leguanen (*Ctenosaura similis*) und 14 grünen Leguanen (*Iguana iguana*) untersucht. Aus keiner der Tupferproben konnte zytopathogenes

Virus isoliert werden. 47 % der Blutproben enthielten Antikörper gegen das Virusisolat 1523/93. Zwei der Utila-Leguane hatten Antikörper gegen das Reovirusisolat 1118/94 und keine der untersuchten Blutproben enthielt Antikörper gegen das Reovirusisolat 1994-01/95, welches von *Anolis carolinensis* isoliert wurde (AMMERMAN, 1999; GRAVENDYCK et al., 1998). Da alle untersuchten Tiere klinisch gesund waren, scheinen Reovirusinfektionen bei frei lebenden Großleguanen dieser Region keine ernstzunehmende Gefahr für die teilweise stark vom Aussterben bedrohten Tiere zu sein.

12 gemeine Höckerechsen (*Xenosaurus grandis*), neun *Xenosaurus platyceps* und zwei *Abronia graminea* wurden in Mexiko gefangen und in Gefangenschaft gehalten. Ein Jahr nachdem die Tiere eingestallt wurden, konnten am Blutproben sowie aus Kloaken- und Rachentupfern der klinisch gesunden Echsen keine Reoviren isoliert werden. Drei der untersuchten gemeinen Höckerechsen zeigten Antikörper gegen das Reptilien-Reovirusisolat 1118/94 (MARSCHANG et al., 2002).

2.2 Zelluläre Einschlusskörper

Werden zelluläre Einschlüsse bei der histologischen Untersuchung beobachtet, stellt sich zunächst die grundlegende Frage, ob die in den betroffenen Zellen befindlichen Massen infektiös oder nichtinfektiös bedingte Veränderungen sind. Aus der Säugetiermedizin sind verschiedene Speicherkrankheiten bekannt, die zur Bildung zellulärer Einschlüsse führen. Meist handelt es sich um Proteinstoffwechselstörungen.

Bei viralen Infektionen gefundene Einschlusskörperchen können sehr spezifisch für einzelne Virusinfektionen sein und somit eine diagnostische Hilfe darstellen (NIBERT und SCHIFF, 2001).

HAUSER et al. (1983) beschreiben eine Herpesvirusinfektion bei Abgottschlangen (*Boa constrictor*). Die gefundenen Einschlüsse waren intranukleär, stellten sich amphophil dar, waren hyalin bis fein granulär und füllten den gesamten Nukleus aus. Durch die im Zellkern angesammelten Massen kam es stellenweise zur Verdoppelung der normalen Kerngröße. Einige der untersuchten Tiere zeigten aus Virionen bestehende Einschlüsse in Leber, Niere, Pankreas und Nebenniere. Elektronenmikroskopisch stellten sich die Viruspartikel wie Herpesvirionen dar.

RAMIS et al. (2000) berichteten von einer durch Adenoviren verursachten nekrotisierenden Hepatitis bei einer *Boa constrictor*. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung wurden basophile und eosinophile intranukleäre Einschlusskörper gefunden.

In Caisacca-Lanzenottern (*Bothrops moojeni*) konnten bei einer Infektion mit Iridoviren zwei Arten von Einschlüssen in Zytoplasma und vereinzelt auch im Kern der Erythrozyten gefunden werden. Die einen stellten kleine Aggregationen mit azidophiler und kristalliner Beschaffenheit dar, sie bestanden aus Viren. Die zweite Art der Einschlüsse war durchscheinend kristallin mit einer hexagonalen Umgrenzung. Alle diese Tiere litten an einer Anämie (JOHNSRUDE et al., 1997).

Die Herpesvirus-Infektion der Landschildkröten führt in den meisten Fällen zur Bildung von intranukleären Einschlüssen in den Epithelzellen der Zunge, aber es wurden auch Einschlüsse in den Mukosazellen des Ösophagus, der Trachea, des Magens und des Eileiters gefunden. In seltenen Fällen wurden auch Einschlüsse in den Hepatozyten beschrieben (MARSCHANG, 2000).

In einer experimentell mit Paramyxovirus (PMV) infizierten Aruba-Klapperschlange (*Crotalus unicolor*) konnten JACOBSON et al. (1997) eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlüsse im vakuolisierten Lungenepithel finden.

Ein wegen zentralnervöser Störungen eingeschlafferter Boelen-Python (*Morelia boeleni*) zeigte neben einer mittelgradigen multifokalen lymphohistiozytären Meningoenzephalitis auch einzelne eosinophile Einschlüsse im Zytoplasma der Gliazellen. Mittels der *in situ*-Hybridisierung konnte PMV-RNS in den Ösophagusganglien und im Gehirn nachgewiesen werden (WEST et al., 2001).

Dass die Bildung von intrazytoplasmatischen eosinophilen Einschlusskörpern ohne weitere Untersuchungen die Diagnose der Einschlusskörperchenerkrankung der Riesenschlangen nicht zulässt, konnten WEST et al. (2001) somit veranschaulichen.

GOMATOS et al. konnten 1962 feststellen, dass zwei Varianten des Reovirusstamms T3D nach Infektion von L929-Zellen wenige Stunden nach Infektion granuläres Material um den Zellkern bildeten. Im weiteren Verlauf akkumulierten diese Einschlüsse und konnten solche Ausmaße annehmen, dass sie den gesamten Zellkern umschlossen. Mittels der Immunfluoreszenz konnte gezeigt werden, dass in den Einschlüssen Virusantigen vorhanden ist. Hatten die Einschlüsse ihre vollständige Größe erreicht, schienen sie zu zerfallen. Die L929-Zellen rundeten sich ab und verloren ihre Haftung zum Untergrund.

Die in diesem Versuch erzeugten Einschlusskörper ließen waren nicht durch eine kombinierte Essigsäure-, Pepsin- und DNase-Behandlung auflösen, wohl aber durch eine Behandlung mit RNase und Pepsin. Wurde nur Pepsin zugegeben, konnte nur ein Teil der Einschlüsse aufgelöst werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die vom Reovirusstamm T3D gebildeten Einschlüsse RNS und Proteine enthalten.

1962 stellten RHIM et al. fest, dass die von ECHO 10 (später Reovirus Typ 1 Stamm 716 genannt) gebildeten Einschlüsse in *Mouse kidney epithelial cells* (MKE-Zellen) vier voneinander zu unterscheidende Stadien durchlaufen. Im ersten Stadium nach ca. 6 Stunden wurden kleine, unregelmäßig geformte, im Zytoplasma verteilte Einschlüsse beobachtet. Nach ca. 12- 24 h waren diese Einschlüsse in ca. 20 % der Zellen zu erkennen. Sie zeigten eine Differenz in Größe und Form. Nach 24- 48 h fusionierten sie zu einem großen, unregelmäßigen Gebilde. Im vierten und letzten Stadium nach 48-72 h konnte in ca. 70 % der Zellen in der Zellkultur ein geschlossener Ring um den Zellkern festgestellt werden, ca. 80 % des Zytoplasmas war mit diesem Material angefüllt. Elektronenmikroskopisch betrachtet sind die von Reovirus Typ1 Stamm 716 in MKE-Zellen gebildeten Einschlüsse eine kristalline Ansammlung von Virusbestandteilen.

Mittels der Färbung mit Acridin-Orange konnte in den Einschlüssen ein hoher RNS-Gehalt nachgewiesen werden. Die Einschlüsse stellten sich in der H&E-Färbung rot und in der Giemsa-Färbung blau dar.

BECKER et al. (2001) zeigten, dass die Einschlüsse von T1L und T3D verschiedene Filamentarten enthalten und im Unterschied zu vielen anderen viralen Einschlüssen nicht mit zellulären Organellen in Verbindung stehen.

In der Literatur wird also zwischen zwei unterschiedlichen Einschlüssen im Zusammenhang mit Orthoreovirusinfektionen berichtet. Zum einen wird von kristallinen Virusagglomeraten und zum anderen von homogenen, RNS und Protein enthaltenden Ansammlungen geschrieben.

Weitere Untersuchungen haben ergeben, dass in mit Reoviren infizierten Fibroblasten ein Abbau und eine Reorganisation der Vimentinfilamente stattfand (SHARPE et al., 1982).

Das Nichtstrukturprotein σ NS und das Strukturprotein μ 2 des inneren Kapsides der Säugetier-Reoviren scheinen für die Bildung der intrazytoplasmatischen Einschlüsse verantwortlich zu sein. So konnten BECKER et al. (2001) bei ihren Versuchen mit temperatursensitiven Mutanten der beiden Proteine feststellen, dass beim Fehlen

des Proteins σ NS keine Einschlüsse gebildet werden. In Zellen, welche mit einer temperatursensitiven Mutante oberhalb der tolerierten Temperaturgrenze infiziert wurden, blieb das Protein σ NS diffus im Zytoplasma verteilt, während das Protein μ 2 in kleinen Herden im Zytoplasma anzutreffen war. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigte sich, dass sich das für die Einschlusskörperbildung benötigte funktionsfähige Protein σ NS vor allem in den perinukleären Bereichen des Zytoplasmas befand, während temperatursensitive Mutanten des Proteins μ 2 keine sichtbare Änderung der Bildung von Einschlusskörpern aufwiesen.

Schon wenige Stunden nach Infektion mit den Reovirusstämmen T1L und T3D konnten σ NS-Proteine im Zytoplasma der infizierten Zelle gefunden werden, nach einigen weiteren Stunden auch μ 2-Proteine im weiteren zeitlichen Verlauf konfluieren diese Proteinansammlungen. Mit der Vergrößerung der Einschlüsse ließ sich eine Schichtung erkennen. Zu Beginn bestanden sie hauptsächlich aus σ NS, später konnte im Zentrum der Einschlüsse dieses Protein nicht mehr nachgewiesen werden. Das Innere der Einschlüsse bestand zu diesem Zeitpunkt aus μ 2, μ 1 und μ 1C. BECKER et al. (2001) schlugen als Konsequenz vor, dass in der intermediären Zone der Einschlüsse, in der alle vier Proteine gefunden wurden, ein Viruszusammenbau stattfand und in der äußersten Schicht in der nur μ NS gefunden wurde, eine aktive Sammlung der anderen Virusproteine durch dieses Protein vorgenommen wurde.

Auch wenn das Auftreten der ersten Einschlüsse über verschiedene Reassortanten gesteuert werden konnte, so scheint doch nicht ein einzelnes Gensegment für die Bildung der Einschlüsse verantwortlich zu sein. Das Reovirus T3D führte in L929-Zellen nach 18 Stunden zur Bildung von intrazytoplasmatischen Einschlüssen während das Reovirus T1L erst nach 39 Stunden zur Bildung intrazytoplasmatischer Einschlüsse führte. Mit verschiedenen Reassortments aus beiden Virusstämmen wurde festgestellt, dass die Segmente M1 und S3 für das schnelle Auftreten der Einschlüsse bei T3D verantwortlich sind aber auch Proteine anderer Gensegmente.

BROERING et al. (2002) konnten in ihrer Studie zeigen, dass die Bildung der bei den Säugetier-Reovirusstämmen T1L und T3D^N gebildeten intrazytoplasmatischen Einschlusskörper abhängig ist vom zellulären Mikrotubuli-Netzwerk. Die von μ NS gebildeten kleinen Einschlüsse blieben verteilt im Zytoplasma liegen, als durch Nocodazol die Polymerisation dieser Zellorganellen unterbunden wurde.

Während das $\mu 2$ Protein des T3D Stammes mit dem Protein μNS globuläre Einschlüsse bildete, bildete dieses Protein des Reovirusstammes T1L filamentöse Einschlüsse. Mit Versuchen an Reassortanten von T3D und T1L Reoviren konnten MBISA et al. (2000) veranschaulichen, dass durch Austausch des M1 Segmentes die Zeitspanne zwischen der Infektion von L929-Zellen und dem Auftreten der Einschlüsse beeinflusst werden kann.

2.2.1 Einschlusskörperchenkrankung der Riesenschlangen (IBD)

Da das in dieser Dissertation verwendete Virusisolat aus einer an der Einschlusskörperchenkrankheit der Riesenschlangen erkrankten Schlange stammt, soll etwas näher auf diese Krankheit eingegangen werden.

Die Erkrankung wird aufgrund ihrer histologischen Erscheinung als "Einschlusskörperchenkrankheit der Riesenschlangen", "inclusion body disease" (IBD), genannt.

Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde bei folgenden Schlangenarten diese Krankheit diagnostiziert:

Tab. 2: Bisher an IBD erkrankte Schlangen

lateinischer Name	deutscher Name	Literaturstelle
<i>Acrantophis madagascariensis</i>	Madagaskaboa	SCHUMACHER, 1992
<i>Boa constrictor</i>	Boa constrictor/ Abgotschlange/ Königsboa	WOZNIAK et al., 2000 SCHUMACHER, 1992 SCHUMACHER et al., 1994
<i>Bothriechis marchi</i>	Palmenlanzenotter	RAYMOND et al., 2001
<i>Candoia carinata</i>	Pazifikboa	ORÓS et al., 1998
<i>Chondropython viridis</i>	Grüner Baumpython	SCHUMACHER et al., 1994 SCHUMACHER, 1992
<i>Corallus caninus</i>	Hundskopfschlinger/ grüne Hundskopfboa	SCHUMACHER et al., 1994

lateinischer Name	deutscher Name	Literaturstelle
<i>Epicrates striatus</i>	Hispaniola Schlankboa Silbergraue Schlankboa	SCHUMACHER, 1992
<i>Eunectes murinus</i>	grüne Anakonda	SCHUMACHER, 1992
<i>Eunectes notaeus</i>	gelbe Anakonda	SCHUMACHER, 1992
<i>Lampropeltis getulus</i>	Wüstenkönigsnatter	CARLINE-NOWAK et al., 1998
<i>Morelia spilota spilota</i>	Diamatpython	CARLINE-NOWAK et al. 1998
<i>Morelia spilota variegata</i>	australischer Teppichpython	CARLINE-NOWAK et al., 1998
<i>Python curtus</i>	Buntpython/ Blutpython	SCHUMACHER, 1992
<i>Python molurus bivittatus</i>	dunkler Tigerpython	JACOBSON et al., 2001 SCHUMACHER et al., 1994
<i>Python regius</i>	Königspython	SCHUMACHER, 1992
<i>Python reticulatus</i>	Netzpython	SCHUMACHER et al., 1994 SCHUMACHER, 1992
<i>Python sebae</i>	Felsenpython	SCHUMACHER et al., 1994 SCHUMACHER, 1992

Die klinischen Symptome umfassen eine Vielzahl unspezifischer Veränderungen. Beim Python wurden hauptsächlich zentralnervöse Symptome angegeben (CARLISLE-NOWAK, et al., 1998; SCHUMACHER et al., 1994). Boaschlangen zeigen vor allem ein Hervorwürgen des Futters ca. 10 Tage nach Aufnahme und einen chronischen Krankheitsverlauf (JACOBSON et al., 2001; SCHUMACHER et al., 1994; WODZNIK et al., 2000). Sowohl bei Python als auch bei Boas werden Ophisthotonus, Desorientiertheit und Wackeln mit dem Kopf in unterschiedlicher Ausprägung beschrieben. Häufig treten im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung Sekundärinfektionen auf (JACOBSON et al., 2001; SCHUMACHER et al., 1994). Hier sind vor allem *Salmonella spp.* von Bedeutung. Von SCHUMACHER et al. (1994) und JACOBSON et al. (2001) wurde in diesem Zusammenhang besonders von Pneumonien und Stomatitiden berichtet.

Im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen wurde im Zeitraum von April 2000 bis Juni 2003 bei 35 Riesenschlangen IBD diagnostiziert.

Die Tiere verstarben nach für diese Erkrankung beschriebenen Symptomen oder wurden aufgrund des Ausbleibens eines Therapieerfolges euthanasiert. Es liegen keine Angaben zur Prävalenz der Erkrankung in Wildtierpopulationen vor.

Die intrazytoplasmatischen eosinophilen Einschlusskörper, welche in zahlreichen Zelltypen bei an IBD erkrankten Schlangen gefunden wurden, entwickelten sich im Laufe der Erkrankung in Größe und Anzahl. Im Laufe der 52 Wochen des Versuches von WOZNIAK et al. (2000) nahmen die gebildeten Einschlusskörper von durchschnittlich 1,5 µm nach 10 Wochen bis zu 4,5 µm am Ende des Versuches an Größe zu. Die Häufigkeit der Einschlüsse nahm vom Anfang der Infektion von 0 Einschlüssen pro starkem Vergrößerungsfeld über durchschnittlich 5 Einschlüsse, nach 10 Wochen bis hin zum Versuchende nach 52 Wochen mit 130 Einschlüssen pro starkem Vergrößerungsfeld zu. Aufgrund der Anfärbbarkeit der Einschlüsse schlossen WOZNIAK et al. (2000) darauf, dass es sich bei den Einschlüssen um Virusproteinablagerungen handelt, die bei der Virusreplikation entstehen.

Es sind bisher in der Literatur verschiedene Methoden beschrieben, um die gefundenen Einschlüsse näher zu charakterisieren.

Tab. 3: Anfärbbarkeit der IBD-Einschlüsse

Darstellungsmethode	Reaktion	Literaturstelle
Feulgen	negativ	SCHUMACHER, 1992
Giemsa	dunkelblau	SCHUMACHER, 1992
H&E	eosinophil	SCHUMACHER, 1992 WOZNIAK et al., 2000 CARLISLE- NOWAK et al., 1998 ORÓS et al., 1998
Kongo rot	negativ	WOZNIAK et al., 2000 SCHUMACHER, 1992
Neurofilament- AK	negativ	WOZNIAK et al., 2000
PAS	negativ	WOZNIAK et al., 2000
		SCHUMACHER, 1992

Darstellungsmethode	Reaktion	Literaturstelle
PTAH	positiv	WOZNIAK et al., 2000
Schiff-Methylen-blau	positiv	SCHUMACHER, 1992
Toluidin-blau	orthochromatisch	WOZNIAK et al., 2000
Thioflavin-T	negativ	WOZNIAK et al., 2000
Vimentin-AK	negativ	WOZNIAK et al., 2000
Ziehl-Neelsen	negativ	SCHUMACHER, 1992
Zytokeratin- AK	negativ	WOZNIAK et al., 2000

Die Erkrankung wird seit den siebziger Jahren beobachtet (SCHUMACHER et al., 1994; JACOBSON et al., 2001). Seit dieser Zeit folgten Berichte aus Nordamerika (JACOBSON et al., 2001; SCHUMACHER et al., 1994; WODZNIAK et al., 2000) Spanien (ORÓS et al., 1998) und Australien (CARLISLE-NOWAK et al., 1998). Dabei wurden zur Einordnung in diesen Krankheitskomplex die als pathognomonisch erachteten, intrazytoplasmatischen Einschlusskörper verwendet.

Bei der pathohistologischen Untersuchung werden im zentralen Nervensystem, im Gastrointestinal- und Respirations- sowie im Urogenitaltrakt die Namen gebenden Einschlusskörper gefunden (SCHUMACHER, 1992). Aber auch in mononukleären Zellen des Immunsystems, in Erythrozyten und im Herzmuskel konnten Einschlüsse nachgewiesen werden (JACOBSON et al., 2001). Die einzigen *intravitalen* Diagnosemöglichkeiten beruhen auf der lichtmikroskopischen Auswertung von Leber- oder Pankreasbiopsien und von Blutaussstrichen. In der amerikanischen Praxis werden auch Biopsien von ösophagealen Lymphozytenansammlungen genommen. Diese Methoden sind nur im positiven Fall aussagefähig, da nicht immer in diesen Organen Einschlusskörperchen gefunden werden.

In der histologischen Untersuchung konnten nekrotische Bereiche in Niere, Leber und Bauchspeicheldrüse gefunden werden. Im zentralen Nervengewebe wurden eine Demyelinisierung der weißen Substanz sowie eine diffuse lymphoplasmazelluläre Infiltration bei *Python sp.* und eine fokale mononukleäre Entzündungsreaktion bei *Boa sp.* festgestellt (SCHUMACHER, 1992). Nur in Ausnahmefällen wurden alle diese pathohistologischen Befunde in den Organen eines Tieres gefunden.

Ein Hinweis, dass es sich bei der Einschlusskörperchenerkrankung der Riesenschlangen um eine infektiöse Erkrankung handelt, wurde 1992 gefunden (SCHUMACHER, 1992). Es wurde eine Primärzellkultur von Nieren eines an IBD

erkrankten Tieres hergestellt. Im Zellkulturüberstand wurden elektronenmikroskopisch Viruspartikel mit einer Retrovirus-Typ-C-artigen Morphologie nachgewiesen. Zwei Tigerpython (*Python molurus*) wurden mit diesem zellfreien Zellkulturüberstand infiziert. Bei einem der Tiere wurden zentralnervöse Symptome nach drei, bei dem anderen nach neun Wochen ausgelöst (SCHUMACHER, 1992). In der histologischen Untersuchung konnten eine nicht-eitrige Enzephalomyelitis mit ausgeprägter mononukleärer Infiltration sowie intrazytoplasmatische eosinophile Einschlüsse im Gehirn und der Bauchspeicheldrüse nachgewiesen werden. Aus beiden Tieren konnte kein Virus reisoliert werden.

Bei der transmissionselektronischen Betrachtung des Ursprungsisolates der Autoren wurden in zytoplasmatischen Vakuolen unausgereifte Viruspartikel gefunden sowie Viruspartikel im extrazellulären Raum. Diese stellten sich als behülltes Virus mit einem hexagonalen Kapsid dar, welches ein zentral liegendes Nukleotid umhüllt. Das reife Virion hat einen Durchmesser von ca. 100 nm. Da diese Viren eine Retrovirus-Typ-C-artige Morphologie hatten, wurde eine Untersuchung zur Bestimmung der reversen-Transkriptase-Aktivität im Serum und im Zellkulturüberstand durchgeführt. Nach der Aufreinigung wurde der Gehalt dieses Proteins in den infizierten und nicht infizierten Zellkulturen gemessen. Zellkulturen mit der höchsten reversen-Transkriptase-Aktivität beinhalten auch die meisten Viren (JACOBSON et al., 2001). In den Zellkulturen wurden keine Einschlüsse beobachtet.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen einer Retrovirusinfektion und der IBD-Erkrankung zu untersuchen wurde von HUDER et al. (2002) eine Bestimmung des reverse-Transkriptase-Gehaltes im Serum verschiedener Spezies gesunder und an IBD erkrankter Schlangen durchgeführt.

Das Ergebnis brachte zu Tage, dass alle untersuchten dunklen Tigerpython (*Python molurus bivittatus*) eine starke Expression eines endogenen Retrovirus zeigten. Ein sehr nahe Verwandter dieses Retrovirus konnte bei einer anderen asiatischen Pythonspezies, dem Bunt-Python (*Python curtus*), nachgewiesen werden. Hier wurde eine schwächere Expression festgestellt. In den untersuchten weißen Blutzellen aller anderen untersuchten *Boiden* konnten diese Retrovirussequenzen nicht nachgewiesen werden.

Da das Vorkommen dieser untersuchten Retrovirus-Sequenzen von der Erkrankung mit IBD unabhängig auftritt, scheint das gefundene Retrovirus nicht für die Erkrankung verantwortlich zu sein (HUDER et al., 2002).

Im Jahr 2000 wurde von WODZNIAK et al. (2000) ein zweiter Versuch unternommen, das auslösende Agens der IBD-Erkrankung zu isolieren und die Kochschen Postulate zu erfüllen. Es wurde ein durch Zentrifugation gewonnener Überstand eines Leberhomogenisates einer an IBD erkrankten Schlange verwendet. Nach 10, 20 und 32 Wochen wurden Leberbiopsien entnommen, und licht- sowie elektronenmikroskopisch auf die Bildung von Einschlusskörpern untersucht. 52 Wochen nach Beginn des Übertragungsversuches wurden alle Tiere euthanasiert, zahlreiche Organe wurden der histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchung zugeführt.

Nach 10 Wochen konnte lichtmikroskopisch bei allen vier infizierten Schlangen intrazytoplasmatische Einschlüsse in den Hepatozyten nachwiesen werden. In keinem der acht Kontrolltiere wurden solche Veränderungen beobachtet.

Bei der TEM-Untersuchung wurden Viruspartikel nachgewiesen, sie stellten sich mit einem Durchmesser von 100-110 nm und einem elektronendichten Core sowie mit einem hexagonalen Kapsid dar. Das gefundene Virus war membranbehüllt. Die Verfasser der Veröffentlichung schließen auf das Vorliegen eines Retrovirus (WODZNIAK et al., 2000).

Sowohl bei den ursprünglichen als auch bei den mit dem Leberhomogenisat infizierten Tieren konnte mit der Gelelektrophorese ein 68 kD schweres Protein nachgewiesen werden. Dieses Protein wurde bei zwei von vier infizierten Schlangen in Geweben gefunden, welche Einschlusskörper enthielten und in keinem der acht Tiere der beiden Kontrollgruppen (WODZNIAK et al., 2000). Das Protein wurde als spezifisch für die bei der Einschlusskörperchenerkrankung der Riesenschlangen gefundenen Einschlüsse angesehen. In einer Aruba-Klapperschlange (*Crotalus unicolor*) konnten JACOBSON et al. (1997) ebenfalls eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlüsse im vakuolisiertem Lungenepithel finden. Das Tier wurde 19 Tage vorher mit einem Paramyxovirus experimentell infiziert. Dieser Versuch wie auch die Untersuchungen von WEST et al. (2001), welche die Bildung von eosinophilen intrazytoplasmatischen Einschlüssen in mit Paramyxovirus-infizierten Zellen darlegen, zeigten, dass auch bei Riesenschlangen die Bildung von intrazytoplasmatischen, eosinophilen Einschlusskörpern nicht ohne weitere

Untersuchungen die Diagnose der Einschlusskörperchenerkrankung der Riesenschlangen zulässt.

Über eine ähnliche Erkrankung bei einer Marchs Palmenlanzenotter (*Bothriechis marchi*) wurde von RAYMOND et al. (2001) berichtet. Das Verteilungsmuster und das elektronenmikroskopische Bild entsprechen den Beschreibungen von IBD auch wenn zusätzlich Organe betroffen waren, in denen bisher bei *Boiden* keine Einschlüsse gefunden wurden. Auch hier konnten in der transmissionselektronischen Untersuchung Retrovirus-artige Partikel in und in der Peripherie der Einschlüsse beobachtet werden.

Ein Unterschied war jedoch bei der Anfärbbarkeit der intrazytoplasmatischen Einschlüsse festzustellen. Während SCHUMACHER (1992) die Einschlüsse nach der Giemsa-Färbung als dunkelblau beschreibt, stellten RAYMOND et al. (2001) fest, dass die Einschlüsse der Palmenlanzen-Otter nach der Giemsa-Färbung hellrot bis magenta waren.

2.3 Salmonellen bei Reptilien

Da in der Mehrzahl der in dieser Dissertation untersuchten Schlangen *Salmonellen* sp. nachgewiesen wurden, soll im Weiteren kurz auf die Bedeutung dieser Bakterien für Reptilien eingegangen werden.

Salmonellen wurden sehr häufig bei Reptilien gefunden (SCHRAMME, 2003). In den meisten Fällen wurden die Bakterien im Magen-Darm-Trakt der Tiere beherbergt und führten in seltenen Fällen als sekundäre Erreger nach Verletzungen, Stress oder Parasitenbefall zu einer Septikämie. Die von ONDERKA und FINLAYSON (1984) veröffentlichten Untersuchungen ergaben einen Salmonellennachweis bei rund 51 % der 90 untersuchten Schlangen. Bei 17 % der untersuchten Tiere wurde als Todesursache eine Salmonellose angegeben, wobei hochgradige nekrotisierende subakute Hepatitiden, hochgradige, subakute nekrotisierende Enteritiden sowie fibrinöse Pneumonien diagnostiziert wurden. Es ist zu beachten, dass Salmonellosen nach Ansicht der Autoren zwar häufig die Todesursache darstellen, aber nicht als die primäre Ursache der Erkrankung zu werten sind.

CAMBRE et al. (1980) untersuchten 317 Reptilien auf Salmonellen und isolierten aus 55 % der untersuchten Schlangen Salmonellen. 36 % der untersuchten Leguane und

3 % der beprobten Schildkröten beherbergten Bakterien dieser Gattung. Bei keinem der untersuchten Tiere konnte eine Beziehung zwischen den klinischen Symptomen und dem bakteriologischen Befund gefunden werden. Bei der pathologischen Untersuchung einiger Tiere wurde eine diffuse Verdickung der Darmwand mit Nekrosen des Epithels beschrieben. In chronischen Fällen wurden Granulome und eine Ulzeration des Epithels beschrieben. Multifokale Lebernekrosen mit Entzündungszell-Infiltration sowie Granulombildung wurde in einigen der Tiere beobachtet, in deren Organen bei der bakteriologischen Untersuchung Salmonellen nachgewiesen wurden. Nekrosen der Arteriolen wurden im Magen-Darm-Trakt aber auch in den Nieren und verschiedenen anderen Organen beobachtet.

Im Gegensatz zu den bei den homoiothermen Tieren gefundenen Serovaren, bei denen zehn Serovare ca. 85 % der Isolate ausmachen, wurden bei Reptilien zahlreiche unterschiedlichste Serovare gefunden, denen keine spezifische Pathogenität zugeordnet werden konnte (CAMBRE et al., 1980; MITCHELL und SHANE, 2000; SCHRAMME, 2003).

Die Untersuchungen in einer kommerziellen Aufzuchtstation für grüne Leguane in El Salvador zeigten, dass die noch im Ei befindlichen Jungtiere keine Salmonellen beherbergten. Die Eischale wurde vermutlich während der Passage durch das Proktodeum des Muttertieres mit diesen Bakterien kontaminiert. Beim Schlupf infizierten sich die jungen Leguane an der Eischale. Eine weitere Infektionsquelle war das Bodensubstrat des Nestes. Während der Involution des Dottersackes gelangten ebenso Salmonellen in den Tierkörper wie später durch Koprophagie (MITCHELL und SHANE, 2000).

2.4 *Entamoeba sp. bei Reptilien*

Da in der Mehrzahl der in dieser Dissertation untersuchten Schlangen *Entamoeba sp.* nachgewiesen wurden, soll im Weiteren kurz auf die Bedeutung dieser Einzeller für Reptilien eingegangen werden.

Eine große Anzahl der Amöben der Gattung *Entamoeba* sind für Reptilien nicht pathogen (FRYE, 1991). Herbivore Reptilien, vor allem Schildkröten, dienen als Reservoir und wurden als Quelle der Erkrankung bei Schlangen und fleischfressenden Echten gesehen (KOJIMOTO et al., 2001).

Das Fehlen der bei Herbivoren ausreichend vorhandenen Zellulose wurde für die Pathogenität von *Entamoeba invadens* in fleischfressenden Reptilien verantwortlich gemacht (FRYE, 1991). Es wurde von nekrotisierenden Enteritiden und Hepatitiden berichtet (JAROFGE und LANGE, 1993).

Gelangen bei Schildkröten als Kommensalen lebende *Entamoeba invadens* über die Trinkwasserversorgung in den Magen-Darm-Trakt fleischfressender Schlangen und Echsen, so verursachten sie eine fulminante Enteritis, teilweise auch eine Hepatitis und Nephritis (FRYE, 1991). Das anatomisch-pathologische Bild stellte sich als eine hochgradige erosive bis ulzerative Enteritis mit fokalen Nekrosen und fibrinonekrotischen Pseudomembranen dar. Das Einwandern der Amöben in das Leberparenchym konnte zu Nekrosen führen, die umliegende Entzündungsreaktion waren geringgradig bis hochgradig (FRYE, 1991).

Auch KOJIMOTO et al. (2001) berichtet von diphtheroid-nekrotisierenden Kolitiden und eitrigen Hepatitiden um in das Leberparenchym eingewanderte Protozoen, Peritonitiden, katarrhalischen Gastritiden, interstitiellen und Pyelonephritiden sowie von eitrigen Pneumonien im Zusammenhang mit *Entamoeba invadens* Infektionen bei vier Königspython (*Python regius*). In einem der vier untersuchten Fälle wurde eine nekrotisierende Enzephalitis um eingewanderte Protozoen beobachtet.

Für die Humanmedizin von Bedeutung ist dieser Erreger nur durch seine histologisch nicht vom Erreger der Amöbenruhr, *Entamoeba histolytica*, zu unterscheidenden Morphologie.

3. Eigene Untersuchungen

Die hier vorgestellten Untersuchungen sollen die Pathogenität des Orthoreovirusisolates IBD26/00 klären.

3.1. Material und Methoden

3.1.1 Versuchsaufbau

3.1.1.1 Herkunft des Virusisolates IBD26/00

Eine adulte *Boa constrictor* mit ZNS-Symptomen, Enteritis und Stomatitis wurde zusammen mit ihren 10 Jungtieren am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen seziert, beim Muttertier sowie bei 5 der Jungtiere wurde pathohistologisch die Diagnose IBD gestellt.

Aus den Organen der sechs IBD positiven Tiere sowie aus den Organen einer weiteren IBD positiven *Boa constrictor* aus einem anderen Bestand, wurde in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Universität Giessen eine virologische Untersuchung durchgeführt.

Aus dreien der Tiere konnte Frau Dr. Rachel E. Marchang ein zytopathogenes Virus nachgewiesen werden. Diese Viren zeigten den gleichen Effekt in VH2-, Vero- und HEF-Zellen. In allen Zellkulturen zeigte das Virus als zytopathischen Effekt die Bildung von Synzytien. In der H&E- und Giemsa-Färbung konnten intrazytoplasmatische Einschlüsse sichtbar gemacht werden. Diese stellten sich eosinophil und violett in der Giemsa-Färbung dar.

Aufgrund der in 10 Segmente unterteilten RNS, der Resistenz gegen Chloroform und der Virusmorphologie wurden die Viren in das Genus der Orthoreoviren eingegliedert.

Das hier verwendete Ursprungsisolat stammt von dem Tier, das am 18.10.2000 mit der Sektionstagebuchnummer S1979/00 am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen seziert wurde und ist eines dieser drei Isolate.

Aus Leber und Niere des Tieres wurden in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Giessen das Virus auf VH2-Zellen isoliert und erhielt dort die Bezeichnung IBD26/00.

3.1.1.2 Versuchstiere

15 juvenile, klinisch gesunde *Boa constrictor* aus einem Wurf wurden aus einer Privathaltung erstanden. Finanzielle Unterstützung für den Erwerb der Tiere erhielt das Projekt von der Deutschen Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde.

Die Schlangen wurden ca. zwei Monate zusammen in einem Raum unter gleichen Bedingungen gehalten. Die Tiere saßen in separaten PVC-Terrarien mit einer Versteckmöglichkeit und einem Trinkgefäß. In regelmäßigen Abständen wurde allen Tieren Blut aus der ventralen Schwanzvene entnommen. Es wurden Blutaussstriche H&E und Giemsa gefärbt und zytologisch untersucht.

Nach einer Randomisierung wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt.

10 Tiere wurden der Gruppe der zu infizierenden zugeordnet, 5 Tiere der Kontrollgruppe. Beide Gruppen wurden darauf hin in zwei getrennten Räumen unter möglichst gleichen Bedingungen gehalten.

Dieser Tierversuch wurde vom 12.04.2002 bis zum 25.03.2003 durchgeführt und erhielt vom Regierungspräsidium Giessen das Aktenzeichen: V/2- 19 c 20 – vg.

3.1.1.3 Infektion

10 Tiere wurden mit 20×10^6 KID₅₀ des Isolates IBD26/00 in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung infiziert.

Die verbliebenen 5 Tiere wurden mit physiologischer NaCl-Lösung schein-infiziert.

Die Tiere wurden intratracheal, intraperitoneal und *per os* infiziert.

Für die tracheale Infektion wurden Weichgummi-Braunülen verwendet, welche den Tieren in die Tracheaöffnung eingeführt wurden. Über diese Braunüle ist 1 ml der Virussuspension in die Lungen verabreicht worden.

Die peritoneale Infektion erfolgte über die Injektion in die Leibeshöhle. Hierfür wurden die Tiere kopfüber gehalten und 1 ml der Virussuspension in den kranialen Abschnitt des kaudalen letzten Drittels des Schlangenkörpers injiziert.

Mit CO₂ getöteten Mäusen wurde 1 ml der Virussuspension in die Subkutis verabreicht. Die so präparierten Mäuse wurden den Schlangen als Futtertiere angeboten.

Eine Übersicht über die Art und Menge der Verabreichung wird in der folgenden Tabelle dargelegt:

Tab. 4: Infektionsdosis der experimentell infizierten Tiere

Tier	intratracheal	intraperitoneal	per os
I1	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
I3	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
I4	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
I7	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
I9	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	Maus nicht aufgenommen
I12	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
I13	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
I14	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	Maus nicht aufgenommen
I16	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
I17	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00	1 ml NaCl IBD26/00
K2	1 ml NaCl	1 ml NaCl	1 ml NaCl
K8	1 ml NaCl	1 ml NaCl	1 ml NaCl
K10	1 ml NaCl	1 ml NaCl	1 ml NaCl
K11	1 ml NaCl	1 ml NaCl	1 ml NaCl
K15	1 ml NaCl	1 ml NaCl	1 ml NaCl

K: Kontrolltiere mit individueller Nummer; I: zu infizierende Tiere mit individueller Nummer; NaCl IBD26/00: 20×10^6 KID₅₀ des Isolates IBD26/00 in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung; NaCl: physiologische NaCl-Lösung

3.1.1.4 Versuchsablauf

Die Tiere wurden einzeln, in für die Haltung von Reptilien empfohlenen PVC-Terrarien gehalten. Fäces wurden täglich gesammelt und bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere Untersuchungen eingefroren.

In regelmäßigen Abständen wurde allen Tieren Blut aus der ventralen Schwanzvene sowie Tupfer von Kloake und Rachen entnommen. Zudem wurden die Tiere gewogen. Ein Blutaussstrich wurde H&E ein anderer nach Giemsa gefärbt.

Die Kloaken- und Rachentupfer wurden für weitere Untersuchungen bei $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Tägliche Kontrollen des Verhaltens wurden ebenso durchgeführt wie die tägliche Messung der Umgebungstemperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit.

Nach 6, 12, 18, 36 und 49 Wochen wurden jeweils eine Kontrollschlange und zwei infizierte Schlangen mit Trapanal®, (Byk Pharmaceuticals, Konstanz) mit einer Dosierung von 34-108 mg/kg euthanasiert.

Nach der Eröffnung der Haut im Bereich des Herzens wurde in die *Vena cava* Heparin in einer Dosierung von 702 IE/kg verabreicht.

Mit Hilfe einer Spritze und einer 0,7 mm Kanüle wurde den Tieren soviel Blut wie möglich entnommen.

Proben für die Virusreisolierung, die histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung sowie für die bakteriologische und die parasitologische Untersuchung wurden entnommen.

Von Leber, Niere, Lunge, Dünndarm, Knochenmark, Rückenmark, Blutzellen und Blutplasma wurden Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für weitere Untersuchungen eingefroren.

Aus Nieren und Lebergewebe wurden Primärzellkulturen hergestellt. Aus Leber, Niere, Thymus, Milz, Trachea, Dünndarm, Blut, Knochenmark, Rückenmark sowie aus den Tupfern von Rachen und Kloake wurde versucht, nach mechanischer Zelllyse und Aufbringen der Suspension auf VH2-Zellen, Virus zu reisolieren.

Für die transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung wurden Proben von Gehirn, Rückenmark, Auge, Trachea, Thymus, Herz, Aorta, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas, kranialem Dünndarm, kaudalem Dünndarm, Kolon, Knochenmark und Niere mit Nebenniere und Gonaden in Glutaraldehyd fixiert und nach ca. 7 Tagen in Epon® eingebettet.

Alle Organe sowie Skelett und Skelettmuskulatur wurden zusätzlich in 3,5 % Formaldehyd-Lösung sieben Tage fixiert. Anschließend erfolgte eine routinemäßige

Einbettung in Paraffin und später für die lichtmikroskopische Untersuchung die Färbung nach Giemsa und mit H&E.

Die bakteriologischen Untersuchungen wurden dankenswerter Weise am Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen von Frau Dr. Astrid König durchgeführt.

Die parasitologischen Untersuchungen wurden dankenswerter Weise am Institut für Parasitologie des FB10 der Justus-Liebig-Universität Gießen von Herrn Dr. Carlos Hermosilla durchgeführt.

3.1.2 Fixierung und histologische Präparation

Die entnommenen Proben wurden in 10 % gekühltem Formalin mit 3,75 % Cacodylatpuffer-Lösung (100 mmol) und einem pH von 7,30 für 7 Tage fixiert.

Die Gewebeproben wurden im Einbettungsautomaten Vogel-Histo-Comp (Vogel, Giessen) bei 60 °C in Paraffin eingebettet.

Die histologische Beurteilung wurde an H&E- und Giemsa-gefärbten Schnitten durchgeführt.

Von den in Paraffin eingebetteten Geweben wurden ca. 5 µm dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden auf Eiweiß-Glyzerin beschichtete Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin-Eosin und nach Giemsa gefärbt.

3.1.2.1 Durchführung der Giemsa-Färbung

1. 5 min entparaffinisieren in Roti-Histol® (Roth, Karlsruhe); anschließend jeweils 5 min in reinem, 90 %; 70 % und 50 % Ethanol sowie in Aqua dest. stellen
2. 120 min bei Zimmertemperatur in 1:50 Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt) färben lassen
3. Färbelösung abschütten und mit Leitungswasser auffüllen
4. zur Differenzierung die Objektträger für wenige Sekunden in verdünnte Essigsäure (3 Tropfen Essigsäure (Roth, Karlsruhe) auf 60 ml Aqua dest.) stellen
5. in 96 % Ethanol stehen lassen bis keine Farbe mehr vom Schnitt in Lösung übergeht
6. 30 Sek. in Isopropanol (Merck, Darmstadt) stellen
7. in Xylol (Roth, Karlsruhe) stellen und mit Eukitt® (Hecht, Kiel-Hasse) einbetten.

3.1.2.2 Histologische Untersuchung

Untersucht wurden: Aorta, Gallenblase, Gehirn, Herz, kaudaler Dünndarm, Knochenmark, Kolon, kranialer Dünndarm, Leber, Lunge, Magen, Milz, Muskulatur, Nasenhöhle, Niere, Ösophagus, Pankreas, Rückenmark, Spinalganglien, Thymus, Trachea und Zäkum aller Tiere, sowohl in der Giemsa-Färbung als auch in der Hämatoxilin-Eosin-Färbung.

3.1.3 Virusisolierung

3.1.3.1 Präparation der Organe für die Primärzellkulturherstellung

Die Virusisolierung erfolgte am Institut für Umwelt und Tierhygiene der Universität Hohenheim. Beste Ergebnisse bei der Isolierung von Reoviren aus an IBD erkrankten Schlangen erzielte Frau Dr. Rachel E. Marschang, wenn sie Primärzellkulturen aus Leber- und Nierengewebe mit VH2-Zellen co-kultivierte.

Die Zellkulturen wurden von mir einen Tag nach der Sektion aus Leber und Nierengewebe angesetzt und von Frau Dr. Rachel E. Marschang, in denen alle drei Wochen eine Passage durchgeführt wurde, auf das Vorliegen eines zytopathogenen Effekts kontrolliert.

Da eine Weiterbearbeitung der Organe zur Primärzellkulturherstellung erst ca. 24 h nach Abschluss der Sektion stattfinden konnte, wurden die ca. haselnussgroßen Gewebstücke in ca. 14 ml Dulbecco's Phosphat Puffer (DPB) bei 6 °C gelagert.

Bevor die Organproben aus den Überführungsgefäßen weiter verarbeitet wurden, wurden sie dreimal mit frischem DPB gewaschen.

Als Medium für alle in diesem Versuch hergestellten und benutzten Zellkulturen wurde Basal Medium Eagle (BME) mit Earleschen Salzen verwendet.

Präparation von Leber und Niere für die Primärzellkulturherstellung:

1. die Proben unter sterilen Bedingungen mit einer Schere zu einem Mus zerkleinern
2. das zerkleinerte Gewebe mit 20 ml DPB für 5 min rühren
3. das Gefäß zur Sedimentation der Zellen für 5 min schräg stellen und den Überstand verwerfen
4. den Schritt 2 und 3 wiederholen
5. die sedimentierten Zellaggregate mit 20 ml Trypsin (6.1.3) 10 min rühren
6. das Gefäß zur Sedimentation der Zellaggregate für 5 min schräg stellen und den Überstand in eine Zentrifugenröhrchen überführen
7. den Schritt 5 und 6 wiederholen
8. die aufgefangene Zell-Trypsin-Suspension 5 min bei 1000 g zentrifugieren und den Überstand verwerfen

9. das entstandene Pellet mit 4 ml BME resuspendieren und
10. 2 ml dieser Suspension auf frisch kultivierte VH2-Zellen geben
11. 2 ml dieser Suspension in ein leeres Petrischälchen geben
12. beide Zellkulturen bei 30 °C inkubieren

3.1.3.2 Präparation der Organe für die routinemäßige Virusisolierung

Aus Leber, Niere, Thymus, Milz, Trachea, Dünndarm, Blut, Knochenmark, Rückenmark sowie aus den Tupfern von Rachen und Kloake wurde versucht, nach mechanischer Zellyse und Aufbringen der Suspension auf VH2-Zellen, Virus zu isolieren.

Präparation der Organe für die routinemäßige Virusisolierung:

1. die Proben unter sterilen Bedingungen mit einer Schere in kleine Stückchen zerkleinern
2. Organstückchen mit BME aufschwemmen
3. Mit dem Ultraschallgerät (Branson, Danbury, USA) drei mal für einige Sek. die Zellwände zerstören
4. Probe 3-10 min bei 1000 g zentrifugieren bis der Überstand klar ist
5. 200 µl des Überstandes auf VH2-Zellkulturen in Petrischälchen mit 3,5 cm Durchmesser geben
6. die beimpften Zellen 2 h bei 30 °C inkubieren
7. 2 ml BME auf die Zellen geben
8. mindestens 3 Blindpassagen (insgesamt 9 Wochen) die Zellkultur täglich beobachten

Als Blindpassage wird die Subkultivierung von Zellen bezeichnet, die, obwohl mit einem potentiell pathogenen Agens geimpft wurden, keinen zytopathogenen Effekt zeigen.

3.1.4 Charakterisierung des Virusisolates und der Reisolat

3.1.4.1 Chloroformbehandlung

Mit dieser Methode wird die Differenzierung behüllter und unbehüllter Viren möglich. Besitzen die Virionen eine Lipidhülle, so wird diese durch Chloroform zerstört und das Virus verliert seine Infektiosität.

Durchführung der Chloroformbehandlung:

1. Zellkulturüberstand infizierter und schon zum größten Teil zerstörter VH2-Zellen bei 1000 g, 5 min zentrifugiert
2. 900 µl des zentrifugierten Zellkulturüberstandes und 100 µl Chloroform (Merck, Darmstadt) zusammengeben und 30 min auf einem Rüttler gut mischen
3. 12 h bei 6 °C ruhig stehen lassen
4. um den zytotoxischen Effekt des Chloroforms zu minimieren, eine 1:10 Verdünnung der oberen virushaltigen Schicht mit BME herstellen
5. 200 µl der Suspension auf VH2-Zellkulturen in Petrischälchen mit 3,5 cm Durchmesser geben
6. die beimpften Zellkulturen 2 h bei 30 °C inkubieren
7. 2-maliges spülen mit 2 ml BME
8. bei 30 °C in Brutschrank stellen und täglich auf einen ZPE untersuchen

Als positive Kontrollen dienen nicht Chloroform ausgesetzte Zellkulturüberstände derselben Isolate. Als negative Kontrolle wurden unbehandelte VH2-Zellen verwendet. Um einen zytotoxischen Effekt des Chloroforms auszuschließen, wurden eine uninfizierte VH2-Zellkultur mit BME inkubiert, welches zuvor ebenfalls wie die Proben mit Chloroform gemischt wurde.

3.1.4.2 RNS-Auftrennung mittels PAGE

Eine Methode, die 10 dsRNS Gensegmente der Orthoreoviren darzustellen, ist, sie über einen Spannungsgradienten auf einer Polyacrylamid-Gelplatte zu separieren.

3.1.4.2.1 Gewinnung der Virus-RNS

Durchführung der RNS-Reinigung:

1. infizierte und schon zum größten Teil zerstörte Zellkulturen mitsamt Überstand einfrieren, um die Zellwände zu zerstören
2. die aufgetaute Zellkultur-Suspension in Zentrifugenröhrchen überführen und bei 1000 g, 10 min zentrifugieren
3. den Überstand bei 104000 g, 3 h ultrazentrifugieren (Beckman L7-65 Rotor, Ultrazentrifuge) und den Überstand verwerfen
4. das Pellet mit 1,5 ml PBS resuspendieren, in 300 µl aliquotieren und bei -70°C einfrieren
5. 300 µl des resuspendierten Virus mit 300 µl Phenol/Chloroform-Isoamylalkohol (Roth, Karlsruhe) in ein Eppendorfgefäß pipettieren
6. auf einem Rüttler für 30 Sek. gut mischen und 5 min bei 12000 g zentrifugieren (Tisch-Zentrifuge 5702 R, Eppendorf, Hamburg)
7. obere wässrige Phase in ein neues Eppendorfgefäß pipettieren und den Rest verwerfen
8. Schritt 5 und 7 wiederholen
9. 25 µl Natriumazetat (Merck, Darmstadt) sowie 650 µl eiskaltes Ethanol (95 %) (Roth, Karlsruhe) dazugeben und für mindestens eine Stunde bei -70°C einfrieren.
10. für 5 min bei 12000 g zentrifugieren,
11. Überstand verwerfen und Pellet mit 100 µl Ethanol (75 %) aufschwemmen
12. auf einem Rüttler für 30 Sek. gut mischen, 10 min bei 12000 g zentrifugieren
13. Schritt 11 und 12 wiederholen
14. Pellet trocknen lassen und mit 100 µl RNase freien Wasser resuspendieren
15. bei -70 °C lagern

3.1.4.2.2 Herstellung der PAGE-Gele

Für die Auftrennung der RNS-Segmente wurde ein 7,5 % Minigel ohne SDS verwendet.

Es wurde die Kammer Mighty Small II, SE 250, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA, verwendet.

Für zwei Mini-Gele wurden folgende Chemikalien in ein sauberes, trockenes Glasgefäß pipettiert

Herstellung der PAGE-Gele:

1. 2,5 ml Trennpuffer (6.2.3), 3 ml Acrylamidbisacryl (30:0,8) (Roth, Karlsruhe), 2,95 ml 8 molare Harnstoff-Lösung, 60 µl 10 % Ammonium-Persulfat (APS) (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in Aqua bidest. und 10 µl TEMED (Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) in ein sauberes Glasgefäß pipettieren
2. die Bestandteile vorsichtig mischen und zügig in die Gelkammern gießen
3. Platzhalter bis zur Aushärtung des Gels einstecken

3.1.4.2.3 Auftrennung der RNS-Segmente über einen Spannungsgradienten

Den Platzhalter aus dem ausgehärteten Polyacryl-Gel herausziehen. Die Slots mit einer feinen Kanüle und Elektrodenpuffer (6.2.2) von eventuell vorhandenen Gelrückständen reinigen.

Mit dem Bio-Rad Model 3000XI, Computer controlled Elektrophoresis Power Supply das Gel zunächst 20 min mit 20 mA von eventuell vorhandenen RNasen reinigen. Mit diesem Spannungsgradienten wird sichergestellt, dass alle fremden, im Gel vorhandenen Proteine das gesamte Gel durchwandern und verlassen.

Nach der Beladung der Slots mit einem 5:1 Gemisch aus resuspendierten RNS und gesättigtem Beladungspuffers (6.2.1) das Gel mit einem Spannungsgradienten von 6 mA über 10 h laufen lassen. Auf diese Weise werden die Gensegmente entsprechend ihrer Größe auf dem Gel separiert.

3.1.4.2.4 Färbung der RNS-Banden

Für die Färbung der aufgetrennten RNS-Segmente wurde das Silver-Staining Kit, Pharmacia Biotech, Freiburg, nach den Angaben des Herstellers verwendet.

Färbung der aufgetrennten RNS-Segmente

1. alle Lösungen nach Angabe des Herstellers ansetzen
2. 30 min in Fixier-Lösung schwenken
3. 30 min in Silber-Lösung schwenken
4. 1 min in Aqua bidest. schwenken
5. Gel in der Entwicklungs-Lösung schwenken bis die gewünschte Farbintensität erreicht ist
6. Gel bis zum fotografieren in Stopp- und Aufbewahrungs-Lösung aufbewahren

3.1.5 Histologische Untersuchung infizierter Zellkulturen

3.1.5.1 Herstellung der infizierten Zellkulturen

Als Medium für die Zellkultur wurde Basal Medium Eagle (BME) mit Earleschen Salzen verwendet.

VH2-Zellen: American Typ Culture Collection (ATCC CCL-140) wurden in Gewebekultur-Flaschen mit Lüftungskappen (Asaki techno glass, Iwaki, Japan) vermehrt.

Einen Tag vor der Infektion wurden 75 ml Zellkultur-Flaschen mit ca. 2,5 Mio. Zellen besiedelt. Um eine ausreichende CO₂ -Konzentration in den Zellkultur-Flaschen zu erreichen, wurden die LüftungsfILTER mit Paraffinfilm luftdicht abgeschlossen. Fünf Zellkultur-Flaschen wurden am nächsten Tag trypsinisiert und ausgezählt, da dabei Werte zwischen 4,0 und 5,4 Millionen Zellen gezählt wurden, wird davon ausgegangen, dass durchschnittlich 4,9 Millionen Zellen beimpft wurden.

Auszählung der Zellkulturen:

1. Zellkulturüberstand von ausgewachsenen VH2-Zellkulturen verwerfen und mit 5 ml BME spülen
2. 2,5 ml Trypsin-EDTA (ICN Biomedicals, Ohio, USA) in Brutschrank bei 37 °C stellen und warten bis sich die Zellen vom Untergrund gelöst haben
3. Zell-Trypsin-Suspension in Zentrifugenröhrchen überführen und 5 min bei 450 g zentrifugieren (Hettich Zentrifuge, 48RC) und den Überstand verwerfen
4. Zellpellet mit 5 ml BME resuspendieren und durch 30-maliges aufziehen in einer 5 ml Pipette die Zellen gut von einander trennen
5. 400 µl Trypanblau und 200 µl Zellsuspension gut mischen durch 30-maliges Aufziehen in einer 400 µl Pipettenspitze und einen Tropfen der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer geben
6. Auf dem Gewebekultur-Mikroskop (Olympus IX70-S8F) vier Lymphozytenfelder auszählen
7. die gewünschte Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche pipettieren und mit 10 ml BME auffüllen

Am folgenden Tag wurden die Zellkulturflaschen mit inzwischen ca. 4,9 Mio. VH2-Zellen, mit 2 ml Zellkulturüberstand infizierter VH2-Zellen 2 h bei 30 °C inkubieren.

Der verwendete infektiöse Zellkulturüberstand stammt von Zellkulturen, welche bis zur völligen Zerstörung des Monolayers durch das verabreichte Virus bebrütet wurden. Jeder der verwendeten Zellkulturüberstände hatte einen abweichenden Titer, weswegen zu jeder Zellkultur-Infektion auch eine Titrationsreihe hergestellt und die KID_{50} nach der SPEARMAN und KAERBER-Formel (HIERHOLZER und KILLINGTON, 1996) errechnet wurde (3.1.5.2). Zur Übersicht sind die unterschiedlichen Zellkulturüberstände in Tabelle fünf zusammengefasst.

Tab. 5: Infektionsdosis der infizierten Zellkulturen

Herkunft des Verwendeten Isolates bzw. Re-Isolates	Passage der infizierten VH2- Zellen	KID ₅₀ in 1 ml
I1 Leber	vierte	$20 \times 10^{2,5}$
I1 Kloakentupfer	vierte	$20 \times 10^{2,3}$
K2 Leber	vierte	$20 \times 10^{1,0}$
I3 Leber	fünfte	$20 \times 10^{2,8}$
I4 Leber	vierte	$20 \times 10^{1,8}$
I14 Leber	fünfte	$20 \times 10^{3,8}$
I16 Leber	vierte	$20 \times 10^{2,5}$
I17 Leber	vierte	$20 \times 10^{2,0}$
IBD26/00 Leber	fünfte	$20 \times 10^{5,5}$

K: Tier aus der Kontrollgruppe mit individueller Nummer; I: Tier aus der Gruppe der Infizierten mit individueller Nummer.

Als negative Kontrolle diente eine VH2-Zellkultur, welche so lange inkubiert wurde, wie die am längsten infizierten Zellkulturen. An Stelle der Inkubation mit 2 ml infiziertem Zellkulturüberstand wurde 2 h mit 2 ml BME inkubiert.

3.1.5.2 Titrationsreihe der zur Infektion der Zellkulturen genutzten Zellkulturüberstände

Um die KID₅₀ des verwendeten Zellkulturüberstandes zu kennen, wurde zu jedem verwendeten Zellkulturüberstand eine Titrationreihe angefertigt.

Durchführung der Virustitration:

1. am Vortag 96-Loch-Platten (MICROTEST™, Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA) mit 30000 VH2-Zellen pro Loch beimpft und mit BME aufgefüllt
2. den Überstand verwerfen
3. 1,8 ml BME vorgeben und 200 µl Zellkulturüberstand darin gut mischen (10 X aufziehen in 200 µl Pipettenspitze (Eppendorf, Greiner))

4. mit einer neuen Pipettenspitze 200 µl der Suspension in ein weiteres Reagenzglas mit 1,8 ml BME geben und gut mischen
5. den Schritt 3 und 4 wiederholen bis eine Verdünnung von 10^{-8} vorhanden ist
6. von der höchsten Verdünnungsstufen ausgehend bis zur niedrigsten jeweils 4 Löcher pro Verdünnungsstufen mit 100 µl versehen
7. 5 Tage bei 30 °C inkubieren
8. nach der SPEARMAN und KAERBER-Formel (HIERHOLZER und KILLINGTON, 1996) die positiven Vertiefungen auszählen und die KID_{50} errechnen.

Als negative Kontrollen dienten ebenfalls mit 30000 Zellen besiedelte Vertiefungen, in die anstatt der jeweiligen verdünnten Virussuspension 100 µl BME + 10 % FKS pipettiert wurde.

Als positiv wurde die Zellkultur in jeder Vertiefung gewertet, die nach fünf Tagen einen zytopathischen Effekt, sichtbar als Synzytienbildung, aufwies.

3.1.5.3 Ernten der infizierten sowie der Kontrollzellkulturen

Als die infizierten Zellkulturen den für das Isolat typischen ZPE ausgeprägt zeigten, wurden sie geerntet und für die Histologie sowie für die Elektronenmikroskopie präpariert.

Durchführung der Zellernte:

1. Unter dem Gewebekultur-Mikroskop (Olympus IX70-S8F) nach dem Auftreten eines ZPE in der infizierten Zellkultur suchen und bei positivem Befund den Überstand verwerfen
2. mit 5 ml BME spülen und mit 5 ml Trypsin-EDTA (ICN Biomedicals, Ohio, USA) in den Brutschrank bei 37 °C stellen und warten bis sich die Zellen vom Untergrund gelöst haben
3. 4 ml der Suspension in eine Zentrifugenröhrchen geben und 1 ml in ein Eppendorfgefäß.

4. das Zentrifugenröhrchen für 5 min bei 450 g (Hettrich Zentrifuge, 48RC) und das Eppendorfgefäß bei 550 g (Hettrich Tischzentrifuge, Microliter) zentrifugieren und Überstände verwerfen
5. 5 ml Formalin (6.3.2) in das Zentrifugenröhrchen und 2 ml Glutaraldehyd (6.3.3) in das Eppendorfgefäß geben und im Kühlschrank (6 °C) bis zur weiteren Bearbeitung fixieren

Nach der 10 tägigen Fixierung in Formalin wurden die Zellpellets bei 60 °C in Vogel-Histo-Comp (Vogel, Giessen) eingebettet und mit dem Färbeautomat Varistain 24-3 von Shandon Hämatoxilin-Eosin gefärbt. Von jedem dieser Zellpellets wurde auch ein Giemsa-gefärbter Schnitt hergestellt (3.1.2.1).

3.1.6 Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchung infizierter Zellkulturen

Die in Glutaraldehyd fixierten Proben wurden für die Transmissionselektronenmikroskopie aufgearbeitet.

Entwässerung und Präparation der Proben:

1. Das Glutaraldehyd verwerfen und 2 X 30 min mit Cacodylatpuffer schwenken
2. 60 min in 1 % Osmium Tetroxid nachfixieren lassen
3. jeweils 30 min in 30 %, 50 %, 70 %, 90 % und reinem Ethanol (Roth, Karlsruhe) zur Entwässerung schwenken
4. 60 min in reinem Propylenoxid (Merck, Darmstadt) schwenken
5. mischen der Kunstharzkomponenten nach Anleitung des Herstellers (Epon®, Embed 812, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, USA) und zu gleichen Teilen mit Propylenoxid mischen, Proben 60 min darin belassen
6. die Proben 120 min im Kunstharzgemisch aus Schritt 5 ohne Propylenoxid infiltrieren lassen, anschließend in eine neu angesetzte Kunstharzmischung geben und bis zur endgültigen Polymerisation in einen Wärmeschränk mit 60°C stellen.

Semidünnschnitte von 0,8 µm und Ultradünnschnitte von 60 nm wurden auf einem Reichert Ultracut E Mikrotom, Leica mit einer Diamantklinge geschnitten. Die für die Lichtmikroskopie geschnittenen Semidünnschnitte wurden mit Toluidinblau gefärbt. Die ultradünn geschnittenen und auf Kupfernetzchen aufgezogenen Proben wurden mit Uranylacetat Dihydrat (Merck, Darmstadt) und Blei(II)citrat Trihydrat (Fluka, Neu Ulm) jeweils für 15 min unter Luftabschluss kontrastiert.

3.1.7 Immunhistologische Untersuchungen an infizierten Zellkulturen

Für die immunologischen Untersuchungen wurden 5 µm dicke Schnitte der fixierten und in Paraffin eingebetteten Zellkulturen auf SuperFrost®/Plus-Objektträger (Menzel Gläser, Braunschweig) aufgezogen und anschließend mindestens 1 h vor dem Ventilator oder über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

3.1.7.1 Seren und Antiseren

3.1.7.1.1 Schweine- und Pferdeserum

Das Blut von gesunden Schlachtschweinen und Pferden wurde nach 2-4 Stunden Stehen bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1500 g zentrifugiert und das Serum gewonnen. Das Serum wurde steril filtriert und zum Konservieren mit 0,05 % Merthiolat versetzt. Bis zur Verwendung wurde das Serum bei -20 °C gelagert.

3.1.7.1.2 Antiseren

3.1.7.1.2.1 Primärantikörper, immunhistologische Nachweismethode, Vorbehandlungsmethode und zum Blocken unspezifischer Antikörperbindungen verwandte Seren

Tab. 6: Herkunft und Anwendung der verwendeten primär- Antikörper

Antikörper/ Klon	Bezugsquelle	Verdünnung	Vorbehandlung, Blocken
Kaninchen- α - IBD26/00	Universität Hohenheim, Ralf Michling	1:2000 in TBS	Zitratpuffer (pH 6) bei 97°C, 20 % Schweineserum
Zytokeratin D5/16B4, M7237	Dako, Hamburg	1:100 in TBS	Protease Typ XXIV (Sigma, Steinheim), 20 % Pferdeserum
Vimentin Klon V9, Mo725	Dako, Hamburg	1:100 in TBS	Zitratpuffer (pH 6) bei 97°C, 20 % Pferdeserum
Aktin, Mo635	Dako, Hamburg	1:100 in TBS	Zitratpuffer (pH 6) bei 97°C, 20 % Pferdeserum
Desmin D33, M760	Dako, Hamburg	1:100 in TBS	Zitratpuffer (pH 6) bei 97°C, 20 % Pferdeserum
Neurofilament 2F11, M762	Dako, Hamburg	1:100 in TBS	Zitratpuffer (pH 6) bei 97°C, 20 % Pferdeserum

Im Institut für Umwelt und Tierhygiene der Universität Hohenheim wurde von Ralf Michling im Rahmen seiner Dissertation ein Antikörper im Kaninchen gegen das Isolat IBD26/00 hergestellt.

Ein Teil des Serums wurde mir dankenswerter Weise für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Als Negativserum stand Prä-Immunserum der Kaninchen zur Verfügung.

3.1.7.1.2.2 Sekundärantikörper, Bezugsquellen und Verdünnung

Tab. 7: Herkunft und Anwendung der verwendeten sekundär-Antikörper

Antikörper/ Klon	Bezugsquelle	Verdünnung
Schwein- α -Kaninchen IgG, ZO196	Dako, Hamburg	1:100
Pferd- α -mouse IgG biotinyliert PA-2000	Vector Lab., Burlingame, USA	1:100

3.1.7.1.2.3 Tertiärantikörper und Detektionssysteme

Tab. 8: Herkunft und Anwendung der verwendeten tertiär- Antikörper

Antikörper/ Klon	Bezugsquelle	Verdünnung
Peroxidase-anti-Peroxidase vom Kaninchen, ZO113	Dako, Hamburg	1:500
Avidin-Biotin-Komplex (ABC), PK5000	Vector Lab., Burlingame, USA	1:100

3.1.7.1.2.4 Antigen-Demaskierung

Tab. 9: Antigen-Demaskierung

Detektiertes Antigen	Vorbehandlung	Konz- entration	Methode	Dauer
IBD26/00 Vimentin Aktin Desmin Neurofilament	Zitratpuffer pH 6,0	10 mM	Zitratpuffer vorwärmen a) 97 °C b) Raum- temperatur	a) 25 min b) 15 min
Zytokeratin	Protease Typ XXIV, (Sigma, Steinheim)	0,05 % in NaCl-PBS	a) 37 °C b) 0-5 °C	a) 6 min b) 3 X 5 min

3.1.7.2 Vorbehandlung zum Nachweis von Orthoreovirus IBD26/00-, Vimentin-, Aktin-, Desmin- und Neurofilament-Antigen

1. 10 min entparaffinieren mit Roti-Histol® (Roth, Karlsruhe), anschließend 2 X 3 min in Isopropanol und 1 X 3 min in 96 % Ethanol
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase:
30 min Inkubation in Methanol mit 0,5 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol® 30 % H₂O₂, Merck, Darmstadt)
3. Waschen der Schnitte mit TBS (6.4.3)
4. Zitratbehandlung
 - a. Zitratpuffer auf 97 °C erhitzen
 - b. 25 min bei 97 °C inkubieren
 - c. 15 min Abkühlen bei Raumtemperatur
5. Aufbringen der Objektträger auf Coverplates™ (Life Science GmbH, Frankfurt/Main) und Einführen der Coverplates™ in die Halterung

3.1.7.3 Nachweis von Orthoreovirus IBD26/00

1. 10 min blocken mit 20 % Schweineserum
2. Inkubation über Nacht bei 6 °C mit dem Primärantikörper Kaninchen- α -IBD26/00 oder dem Prä-immunserum der Kaninchen als negative Kontrolle
3. 3 X 5 min Schnitte mit TBS spülen
4. 30 min Inkubation mit PAP vom Kaninchen
5. 2 X 5 min mit TBS waschen und Objektträger aus Coverplates™ nehmen und in TBS stellen

3.1.7.4 Nachweis von Vimentin, Aktin, Desmin und Neurofilament

1. 10 min blocken mit 20 % Pferdeserum
2. Inkubation über Nacht bei 6 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper
3. 3 X 5 min mit TBS spülen
4. 30 min Inkubation mit biotinyliertem Pferd- α -mouse IgG
5. 3 X 5 min mit TBS spülen
6. 30 min Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex
7. 2 X 5 min mit TBS spülen, Objektträger aus den Coverplates™ nehmen und in TBS stellen

3.1.7.5 Nachweis von Zytokeratin

1. 10 min entparaffinieren mit Roti-Histol® (Roth, Karlsruhe), anschließend 2 X 3 min Isopropanol, 1 X 3 min in 96 % Ethanol
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase:
30 min Inkubation in Methanol mit 0,5 % frisch zugesetztem H₂O₂ (Perhydrol® 30 % H₂O₂, Merck, Darmstadt)
3. Schnitte 5 min bei 37 °C in PBS (6.4.2) stellen
4. 6 min bei 37 °C in 0,05 % Protease, Typ XXIV (Sigma, Steinheim) Lösung stellen
5. 3 X 5 min in eiskaltem Wasser die Reaktion stoppen
6. die Objektträger in Coverplates™ überführen
7. 10 min blocken mit 20 % Pferdeserum
8. Inkubation über Nacht bei 6 °C mit dem Primärantikörper Zytokeratin
9. 3 X 5 min mit TBS spülen
10. 30 min Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex
11. 2 X 5 min mit TBS spülen, Objektträger aus Coverplates™ nehmen und in TBS stellen

3.1.7.6 Nachbehandlung und Eindecken der Schnitte

1. 10 min Inkubation der Schnitte unter ständigem Rühren in einer Küvette mit 3,3'-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Fluka, Neu Ulm) mit 0,01 % H_2O_2 in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1)
2. 3 X 5 min mit TBS spülen, 1 X 5 min mit Aqua dest. spülen
3. 10 Sek. gegenfärben in Papanicolaous Hämatoxilin (Papanicolaous, Merck, Darmstadt; 1:10 in Aqua dest.),
4. 5 min in Leitungswasser bläuen
5. Entwässern in aufsteigender Ethanolreihe (50, 70 und 96 %) für jeweils 3 min, 2 X 3 min in Isopropanol und 2 X 3 min in Roti-Histol®.
6. Eindecken der Schnitte mit Eukitt® (Hecht, Kiel-Hasse)

3.1.8 Immunhistologischer Nachweis von Reovirusantigenen im Organschnitt

Es wurde nach den Standardprotokollen des Institutes für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen versucht, unter Verwendung der Demaskierung mit Zitratpuffer pH 6,0 (6.4.4), TUF® (Target Unmasking Fluid, Kreatech Diagnostics), Trypsin und Protease, Typ XXIV (Sigma, Deisenhofen) das Antigen in den Paraffin-eingebetteten Organen der Versuchsschlangen darzustellen. Zur Verstärkung der Signale wurde mit PAP (Dako, Hamburg), Avidin-Biotin-Komplex (ABC) (Vector Lab., Burlingame, USA), Avidin-Biotin-Komplex-Elite-Kit (Vector Lab., Burlingame, USA) sowie Streptavidin mit und ohne Tyraminverstärkung (Dianova, Hamburg) gearbeitet.

3.1.9 Negative staining der Kotproben

3.1.9.1 Durchführung

Die Kotproben wurden im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen von Herrn Dr. Werner Herbst und Herrn Häuser bearbeitet. Die Ultraschall-behandelten, vor- und ultrazentrifugierten sowie resuspendierten Proben wurden auf eine Paraffin-beschichtete Platte getropft und das in Punkt 3.1.9.2 hergestellte Netzchen mit der beschichtete Seite auf den Tropfen gelegt. Nachdem die Viren 15 min Haftung zur Serovarfolie aufnehmen konnten, wurde die Proben mit der beschichteten Seite 2-mal fünf Minuten auf frische Tropfen 2 % Wolframato-phosphorsäure (Merck, Darmstadt) gelegt. Zwischen diesen Schritten wurde mit einem Baumwollläppchen vorsichtig der Überstand des letzten Schrittes vom Netzchen gesaugt. Nach dem die Proben ca. 5 min kontrastiert wurden, wurden sie auf eine saubere trockene Unterlage gelegt.

Im Transmissionselektronenmikroskop (ZEISS, Elektronenmikroskop EM 10C/CR) wurde jedes Netzchen 15 min auf Reoviruspartikel durchmustert.

3.1.9.2 Herstellung der Trägerfolien für das negative staining

1. 0,25 g Formvar (Monsanto Chemical Company, Missouri, USA) in 100 ml gefiltertem und getrocknetem Dichloräthan in einer dunklen Flasche lösen und ca. 24 h stehen lassen
2. Objektträger mit reinem Ethanol (Roth, Karlsruhe) abreiben anschließend mit Aqua. dest. abwaschen und zum trocknen bei ca. 50 °C in den Wärmeschränk stellen
3. Formvar-Lösung durch einen Papierfilter laufen lassen und den Objektträger ca. 2 Sekunden hineintauchen
4. zum Schutz vor Staub die Folie auf dem Objektträger unter einem umgedrehtem Becherglas für ca. 10 min trocknen lassen
5. Küvette mit Wasser füllen, ca. 5 mm vom Rand des Objektträgers die hauchdünne Formvarfolien durchtrennen
6. den Objektträger langsam schräg unter Wasser drücken und durch pusten die Formvarfolie vom Objektträger lösen
7. auf die schwimmende Formvarfolie für die TEM gebräuchliche Kupfernetzchen auflegen
8. mit einem Papier die oben liegende (nicht mit Formvarfolie benetzte) Seite der Netzchen unter die Wasseroberfläche ziehen und aus dem Wasser fischen
9. nach einigen Stunden im Trockenschrank die getrockneten beschichteten Netzchen auf dem Papier in einem Exsikkator überführen. Bei Bedarf ein Netzchen mit der Pinzette vom Untergrund nehmen

3.1.9.3 Material

Tab. 10: Untersuchte Kotproben

	1. Kotprobe	2. Kotprobe	3. Kotprobe	4. Kotprobe
I1	11.05.02			
I3	14.05.02	02.07.02		
I4	31.05.02	02.07.02		
I7	27.05.02	26.7.02	07.10.02	
I9	05.05.02	09.07.02	08.08.02	23.09.02
I12	15.05.02	08.07.02	11.08.02	
I13	05.05.02	15.07.02	09.08.02	19.09.02
I14	03.06.02	09.07.02		
I16	13.05.02	01.07.02		
I17	11.05.02			
K2	06.05.02	16.07.02		
K15	11.05.02	09.07.02	07.10.02	

K: Tier aus der Kontrollgruppe mit individueller Nummer; I: Tier aus der Gruppe der Infizierten mit individueller Nummer. Grau hinterlegt sind die Tiere, aus deren Organen Viren reisoliert wurden.

3.1.10 Probennahme für die bakteriologische Untersuchung:

Es wurden Proben von Leber, Niere, Lunge, Dünndarm, Zäkum und Kolon direkt im Anschluss an die Euthanasie entnommen, einzeln verpackt und über Nacht bei 6 °C gelagert. Am folgenden Tag sind die Proben im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen von Frau Dr. Astrid König untersucht worden.

3.1.11 Probennahme für die parasitologische Untersuchung

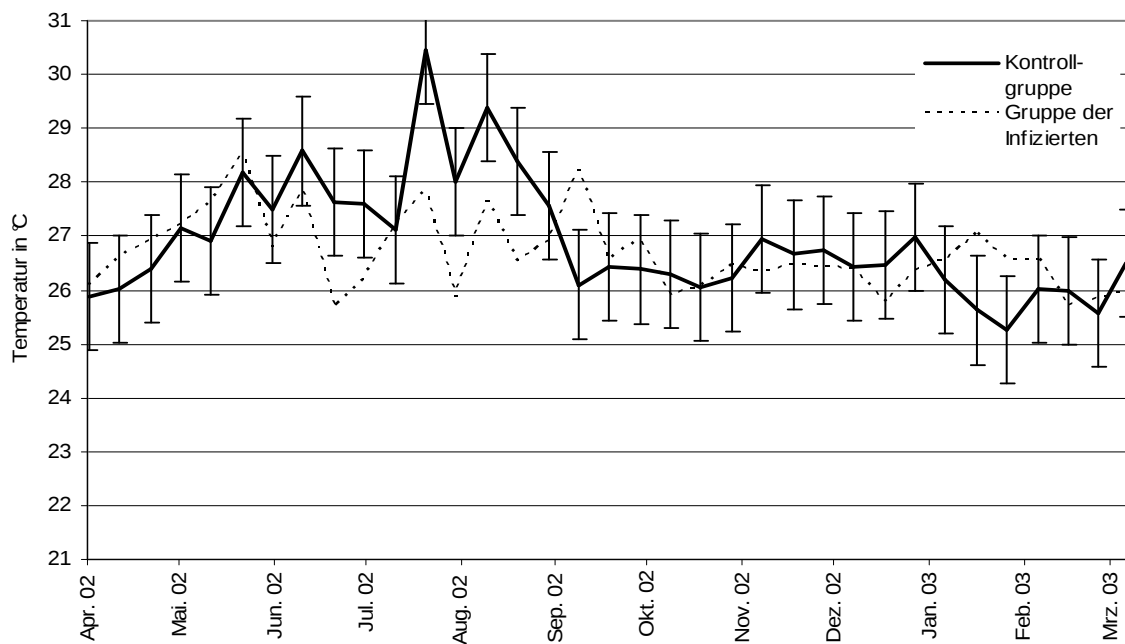
Zur parasitologischen Untersuchung gelangte Kloakeninhalt. Die Proben wurden während der Sektion entnommen und am folgenden Tag von Herrn Dr. Carlos Hermosilla im Institut für Parasitologie des FB 10 der Justus-Liebig-Universität Giessen untersucht. Hierzu wurde das SAF (Sodium acetate-acetic acid-formaledehyde-Verfahren) genutzt.

3.2 Ergebnisse

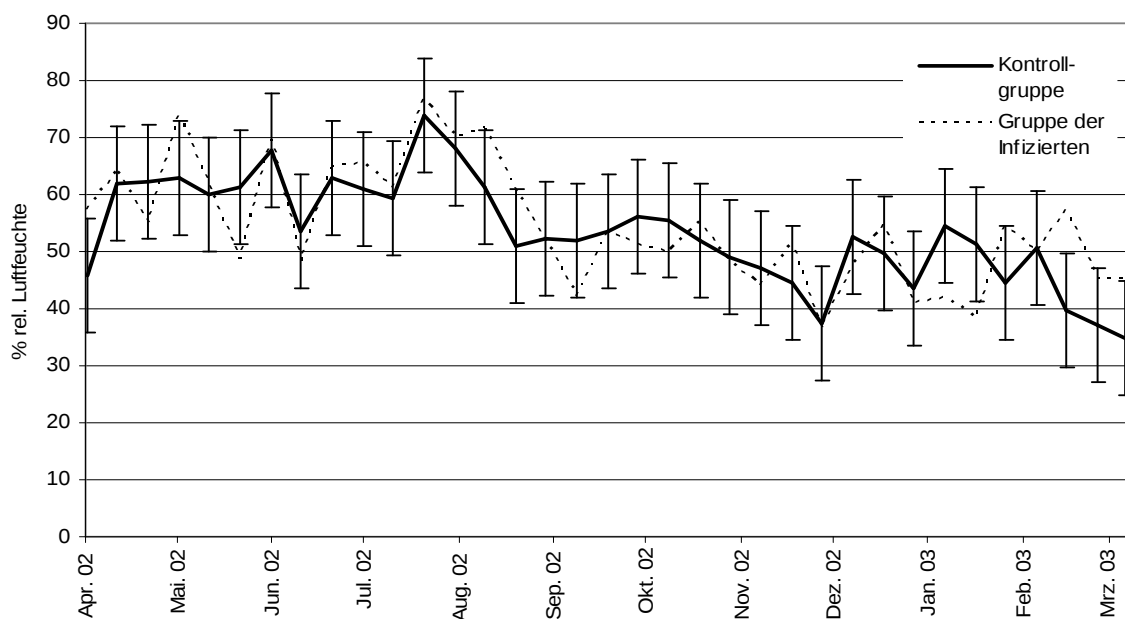
Die vor Versuchsbeginn entnommen Blutproben waren alle unauffällig.

In den beiden folgenden Grafiken ist die mittlere Temperatur von 10 Tagen sowie die mittlere relative Luftfeuchtigkeit von 10 Tagen vergleichend dargestellt.

Grafik 1: Mittlere Raumtemperatur in den Tierversuchsställen



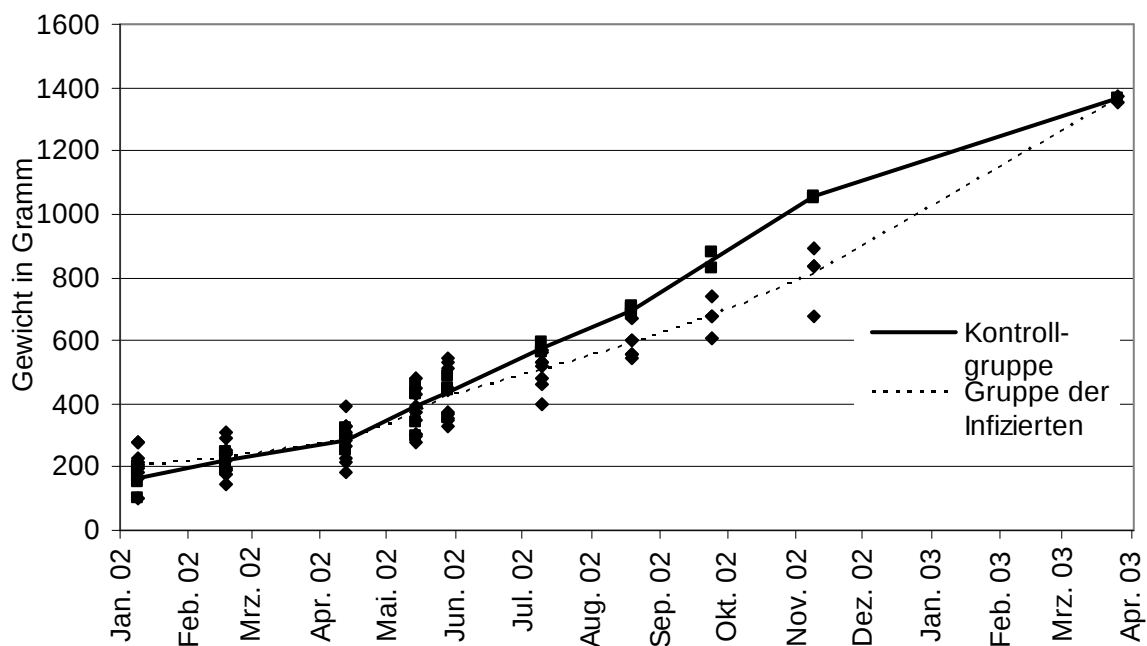
Grafik 2: Mittlere Luftfeuchtigkeit in den Tierversuchsställen



3.2.1 Intravitale Veränderungen

Im Verlauf der ersten sechs Monate nach der Infektion bzw. Scheininfektion der Tiere zeigten die infizierten Tiere bei gleicher Futtermittelaufnahme eine geringere Gewichtszunahme als die Kontrolltiere.

Grafik 3: Gewichtsentwicklung der Tiere im Laufe des Versuchs



Grafisch dargestellt lässt sich erkennen, dass die Gruppe der infizierten Tiere ab Mitte April (Zeitpunkt der Infektion) eine deutlich geringere Gewichtszunahme zeigt als die Gruppe der Kontrolltiere. Es muss beachtet werden, dass die Gruppe der infizierten Tiere nach dem 11.11.2002 nur noch aus zwei Tieren und die Gruppe der Kontrolltiere nur noch aus einem Tier bestand. Das Kontrolltier zeigte zwischen dem 24.12.02 bis zum 15.02.03 eine totale Inappetenz. Jedoch zeigte das Tier nach dem 15.02.03 einen enormen Appetit. In der Zeit zwischen dem 24.12.02 und dem 25.03.03 hat die Kontrollschlange 26 Mäuse gefressen, die Schlangen der infizierten Gruppe jeweils 23.

3.2.2 Pathohistologische Befunde

Aus den Lebern der infizierten Schlangen I1 und I17 wurde 6 Wochen nach der Infektion Virus isoliert, bei der mikroskopischen Untersuchung der Tiere wurde eine fokale bis multifokale gemischtzellige Infiltration des Leberparenchyms beobachtet (Abb.3).

12 Wochen nach der Infektion wurden multifokale geringgradige gemischtzellige Infiltrationen im Lebergewebe der infizierten und virologisch positiven Schlange I3 festgestellt.

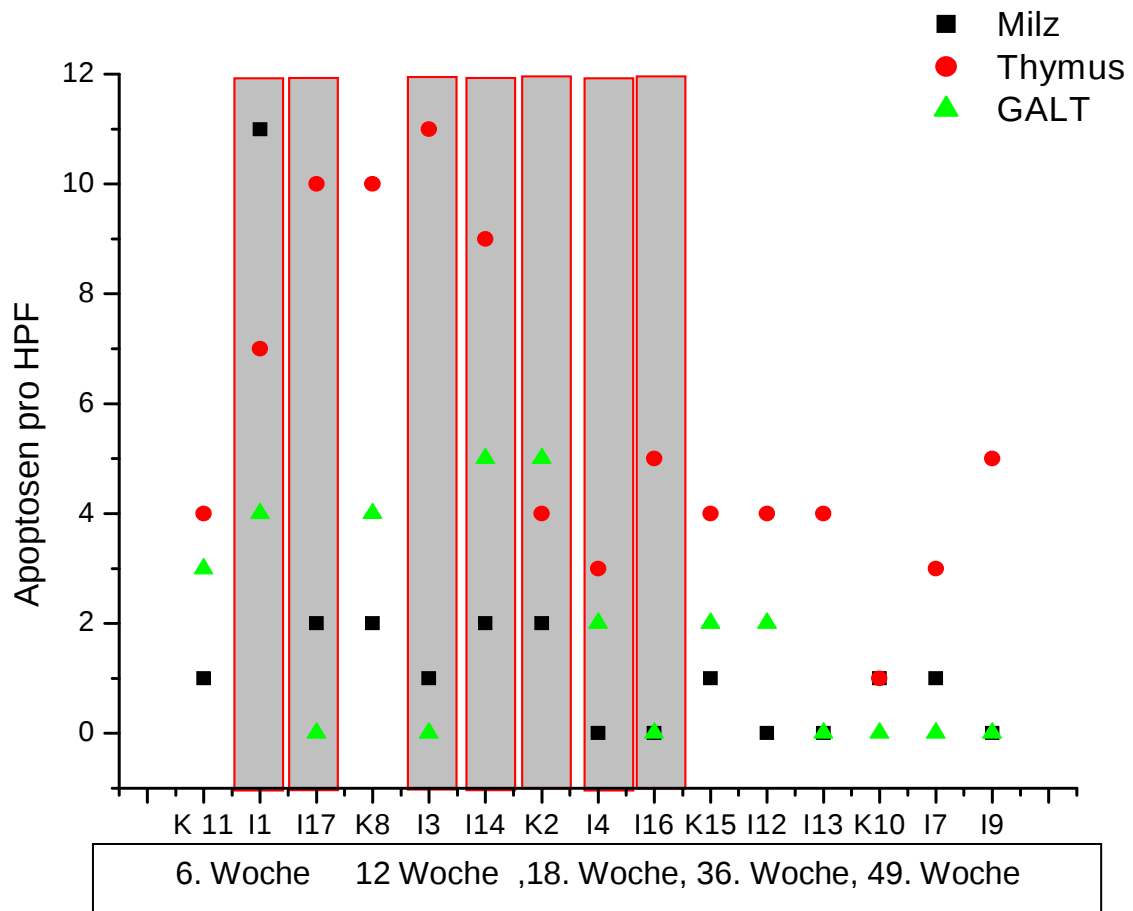
Bei einem der Tiere aus der Gruppe der infizierten Tiere, bei welchem aus Leber und Niere Reoviren isoliert werden konnten, zeigte der Dünndarm eine erhöhte Anzahl an Apoptosen im Epithel. Das Tier K8 zeigte im Dünndarm ebenfalls eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen. Aus diesem Tier wurde in keinem Organ Virus nachgewiesen.

In den nach Literaturangaben bekannten, bei einer Reovirusinfektion typischerweise betroffenen Zellen (Lymphfollikel, Myozyten, Hepatozyten, Gallengangszellen) wurden keine Veränderungen festgestellt.

Es wurde kein signifikanter Unterschied in der Zahl der apoptotischen Lymphozyten pro HPF in Milz, Thymus und im Darm-assoziierten lymphatischen Gewebe zwischen den infizierten und den nicht infizierten Tieren festgestellt (Grafik 4). Zu Beginn der Untersuchung wurde eine deutlich höhere Zahl an apoptotischen Zellen im Thymus beobachtet, als in den später seziierten Versuchsgruppen, dies wird auf das Alter und der damit verbundenen Thymusivolution der Tiere zurückgeführt.

Die mannigfaltigen unspezifischen Veränderungen sind im Anhang zusammengefasst (Tab. 15- 23).

Grafik 4: Apoptosen in Milz, GALT und Thymus



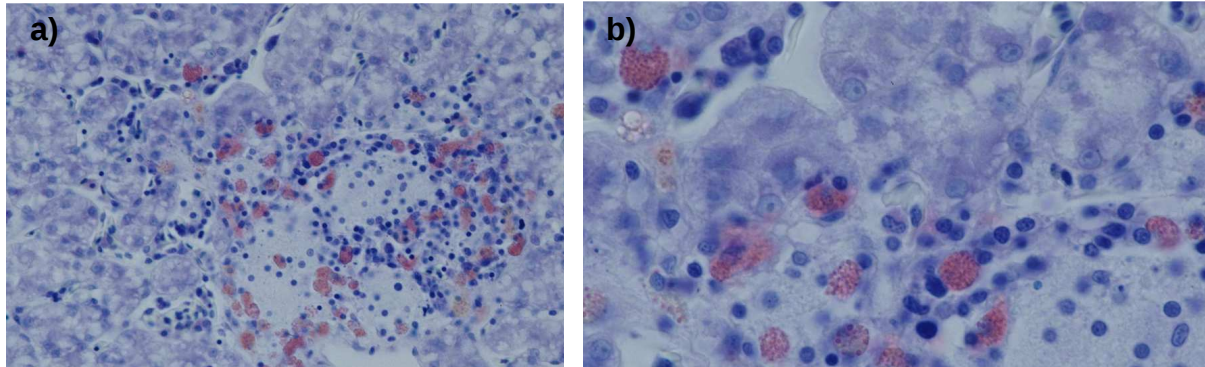
GALT: gastrointestinales lymphatisches Gewebe, I: Tier aus der Gruppe der Infizierten mit individueller Nummer, K: Tier aus der Kontrollgruppe mit individueller Nummer. Die grau hinterlegten Felder stellen die Tiere dar, aus deren Organen Reoviren reisoliert wurden.

Es wird deutlich, dass keine Korrelation zwischen der Anzahl der apoptotischen Zellen und dem virologischen Befund besteht.

In der Niere des infizierten Tieres I1, aus welcher Orthoreoviren isoliert wurden konnte eine fokale geringgradige gemischtzellige Infiltration beobachtet werden. Aus dem Dünndarm konnte bei keinem der Tiere Virus isoliert werden. Histologisch stellte sich der Darm des Versuchstieres I4 aber durch seine massiv auftretenden Apoptosen und durch eine hochgradige lymphoplasmazelluläre Infiltration wie eine Enteritis dar. Bei der Sektion wurde allerdings weder eine Rötung der Schleimhaut noch eine veränderte Konsistenz des Darminhaltes festgestellt. Auch das Kontrolltier K11 zeigte eine erhöhte Anzahl an Apoptosen und eine starke Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen im Dünndarm (Abb. 4). Aus dem Darmgewebe wurden bei der virologischen Untersuchung kein Virus isoliert.

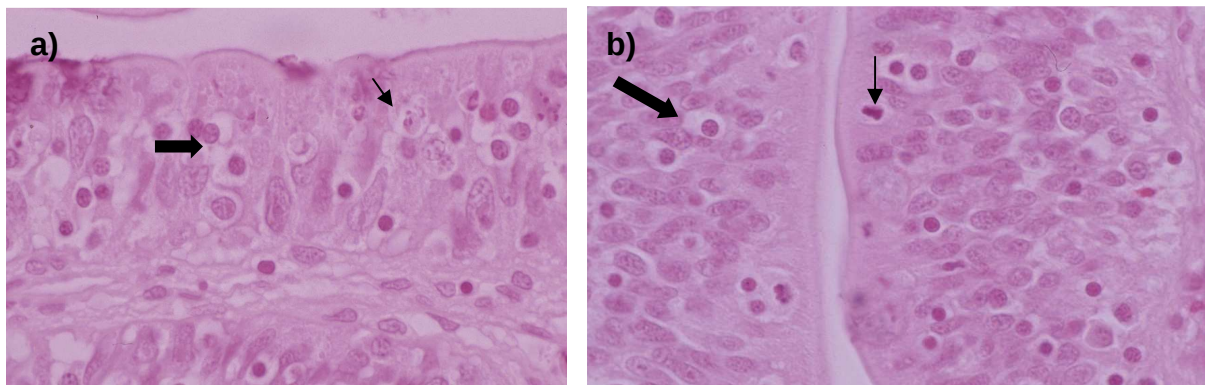
Das bei der virologischen Untersuchung Reovirus-positive Kontrolltier K2 zeigte eine hochgradige diffuse glomeruläre Verkalkung.

Abb. 3: Nekroseareale in IBD26/00 infizierten Lebern



Die Abbildungen 3a) und 3b) stellen miliare Nekroseareale der Orthoreovirus positiven Leber des infizierten Tieres I3 dar; a) 40er Objektiv, Giemsa; b) 100er Objektiv, Giemsa. Die roten Zellen sind heterophile Granulozyten, welche den neutrophilen Granulozyten der Säugetiere entsprechen.

Abb. 4: Lymphozyteninfiltration ins Darmepithel



Die Abbildung 4a) stellt einen Bereich des kranialen Dünndarms des Tieres I4 dar. Es können eine mittel- bis hochgradige Infiltration mit Lymphozyten (dicker Pfeil) sowie vereinzelte Apoptosen (dünner Pfeil) beobachtet werden, 100er Objektiv, H&E. Die Abbildung 4b) stellt einen Bereich des kranialen Dünndarms des Tieres K11 dar, es können eine mittel- bis hochgradige Infiltration mit Lymphozyten (dicker Pfeil) sowie vereinzelte Apoptosen (dünner Pfeil) beobachtet werden, 100er Objektiv, H&E.

3.2.3 Virusisolierung und -charakterisierung

Die Virusisolierung fand am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim statt. Frau Dr. Rachel E. Marschang untersuchte die mit dem Organhomogenat bzw. mit den lebenden Zellen von Leber und Niere beimpften Zellkulturen) 9 Wochen lang täglich auf das Auftreten eines zytopathischen Effekts.

Die für das Ursprungsisolat IBD26/00 typischen Synzytien wurden je nach untersuchtem Organ und der gewählten Methode nach unterschiedlichen Zeiten festgestellt.

Alle drei Wochen erfolgte eine Passage der infizierten Zellkulturen, zeigten sie auch nach der dritten Blindpassage keinen ZPE, wurde das untersuchte Organ als negativ bewertet.

Bei der virologischen Untersuchung wurde in den ersten zwei Gruppen, 6 und 12 Wochen *post infectionem*, bei allen infizierten Tieren Virus über die Zellkultur nachgewiesen. Aus keinem der Kontrolltiere wurden Viren isoliert.

In der dritten Gruppe, 18 Wochen nach der Infektion, konnte aus allen seziierten Tieren Virus isoliert werden, den Infizierten sowie dem Scheininfizierten.

Die beiden letzten Gruppen, 30 und 49 Wochen *post infectionem*, blieben bei der virologischen Untersuchung negativ.

Die Tabelle 11 stellt die verschiedenen Methoden der Virusisolierung gegenüber. Zunächst werden alle Organe aufgelistet, bei denen mit Hilfe der Zelllyse versucht wurde Viren freizusetzen. In der nächsten Spalte werden die Organe aufgelistet bei denen auf diese Weise Viren isoliert werden konnten. Organe aus denen lebende Zellen separiert wurden um VH2-Zellkulturen zu infizieren sind in der nächsten Spalte aufgelistet. In der letzten Spalte werden die Organe genannt bei denen durch die zweite Methode Virus isoliert werden konnte.

Tab. 11: Zusammenfassung der virologischen Untersuchung

		untersuchte Organe mittels der Zelllyse	positive Organe nach der Infektion mit Zelllysate	Untersuchte Organe mittels der Zellseparierung	positive Organe nach der Infektion mit separierten Zellen
6. Woche p.i.	K11	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Kl.- tupfer, Ra.-Tupfer,	keine	Le., Ni.	keine
	I1	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Kl.- tupfer, Ra.-Tupfer,	Le., Kl.-tupfer	Le., Ni.	Le., Ni.
	I17	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Kl.- tupfer, Ra.-Tupfer,	Le., KM	Le., Ni.	Le., Ni.
12. Woche p.i.	K8	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Kl.- tupfer, Ra.-Tupfer,	keine	Le., Ni.	keine
	I3	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Kl.- tupfer, Ra.-Tupfer,	Le.	Le., Ni.	Le., Ni.

Tab. 11 (Fortsetzung):

		untersuchte Organe mittels der Zelllyse	positive Organe nach der Infektion mit Zelllysate	Untersuchte Organe mittels der Zellseparierung	positive Organe nach der Infektion mit separierten Zellen
	I14	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Kl.- tupfer, Ra.-Tupfer,	Le.	Le., Ni.	Le., Ni.
18. Woche p.i.	K2	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Mi., Thy., Kl.-tupfer, Ra.- Tupfer,	keine	Le., Ni.	Le., Ni.
	I4	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Mi., Thy., Kl.-tupfer, Ra.- Tupfer,	keine	Le., Ni.	Le., Ni.
	I16	Le., Ni., Lu., Tra., Düda., KM, RM, Blutz., Mi., Thy., Kl.-tupfer, Ra.- Tupfer,	keine	Le., Ni.	Le.

Le.: Leber; Ni.: Niere; Lu.: Lunge; Tra.: Trachea; Düda.: Dünndarm; KM: Knochenmark; RM: Rückenmark; Blutz.: Blutzellen; Mi.: Milz.; Thy.: Thymus; Kl.-tupfer: Kloakentupfer; Ra.-Tupfer: Rachentupfer; p.i.: *post infectionem*

Nach der 18. Woche *post infectionem* keine Viren reisoliert.

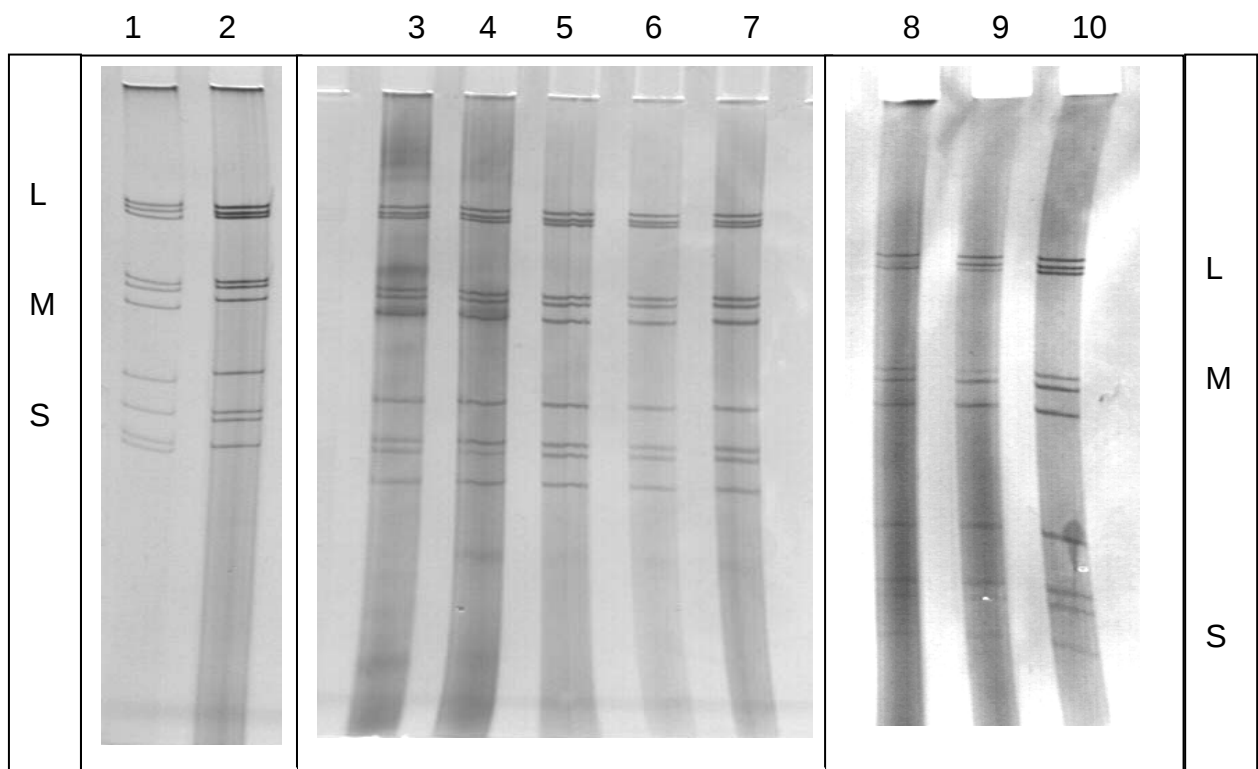
3.2.3.1 Chloroformbehandlung der isolierten Viren

Es konnte keine Abnahme der Infektiosität der Viren nach einer zwölfstündigen Inkubation mit Chloroform festgestellt werden. Das Auftreten des zytopathischen Effekts (ZPE) erfolgte zeitgleich und mit der gleichen Intensität in den mit Chloroform behandelten wie in den unbehandelten Zellkulturüberständen infizierter Zellkulturen. Die mit uninfiziertem Zellkulturüberstand inkubierten VH2-Zellen zeigten keinen zytopathischen Effekt.

3.2.3.2 RNS-Auftrennung mittels der PAGE

Die über den Spannungsgradienten separierten Gensegmente stellten sich nach der Silberfärbung wie folgt in dem PAGE-Gel dar.

Abb. 5: PAGE des original Isolates und der reisolierten Viren



Legende auf Seite 64

Legende Abb. 5:

RNS Elektrophorese: 1. Säugetier-Reovirus T3D; 2. Ursprungsisolat IBD26/00; es folgen die reisolierten Viren: Bahn Nr. 3: Isolat I16; 4: I17; 5: I1KI.; 6: I3; 7: I14; 8: K2, das Mittlere der drei großen Gensegmente lässt sich auch nach mehrmaliger

Präparation nicht deutlich darstellen; 9: I4, das schwerste der drei mittleren Gensegmente lässt sich auch nach mehrmaliger Präparation nicht deutlich darstellen; 10: I1.

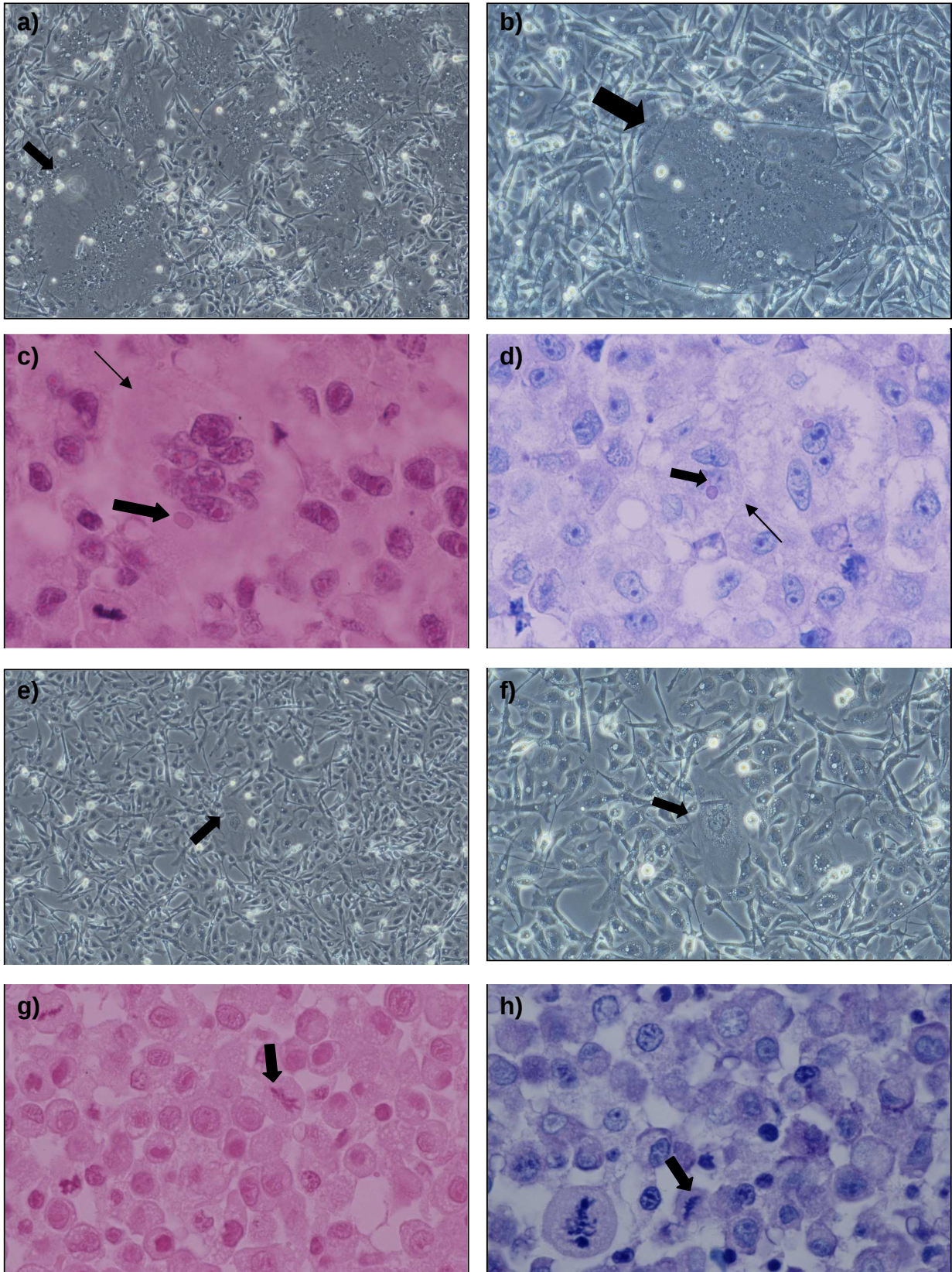
Alle aufgetrennten Gensequenzen zeigten die typische Orthoreovirus-Architektur. Zu erkennen sind drei große (L), drei mittelgroße (M) und vier kleine (S) Gensequenzen.

3.2.3.3 Histologische Untersuchung infizierter Zellkulturen

VH2-Zellkulturen, welche mit dem Ursprungsisolat oder mit den aus den Lebern und der Kloake isolierten Viren infiziert wurden, zeigten alle die gleichen zytopathischen Veränderungen. Es bildeten sich große bis flächenhafte Synzytien. Bei der Färbung nach Giemsa konnten in diesen Synzytien und vereinzelt auch in singulären Zellen homogene, violette Einschlüsse im Zytoplasma gefunden werden. Nach der Färbung mit Hämatoxylin-Eosin wurden in den Synzytien und vereinzelt auch in noch einzeln stehenden Zellen eosinophile intrazytoplasmatische Einschlüsse gefunden.

Auffällig war das Verhalten des Isolates K2, welches sich durch einen sehr geringen Titer in den infizierten Zellkulturen auszeichnete. Auch nach der völligen Zerstörung des VH2-Monolayers konnte nur eine KID_{50} von $20 \times 10^{0,5}$ /ml festgestellt werden. Das Ursprungsisolat und die Isolate aus den infizierten Tieren zeigten in diesem Stadium eine KID_{50} von $20 \times 10^{1,8}$ - $10^{5,5}$ /ml. Das Isolat aus dem Kontrolltier K2 musste im Vergleich zu den Isolaten aus den experimentell infizierten Tieren wesentlich länger bebrütet werden, um das gleiche Ausmaß der Veränderungen in der Zellkultur zu verursachen.

Abb. 6: Reovirus-infizierte Zellkulturen und Kontrollzellkulturen



Legende auf Seite 66

Legende Abb. 6:

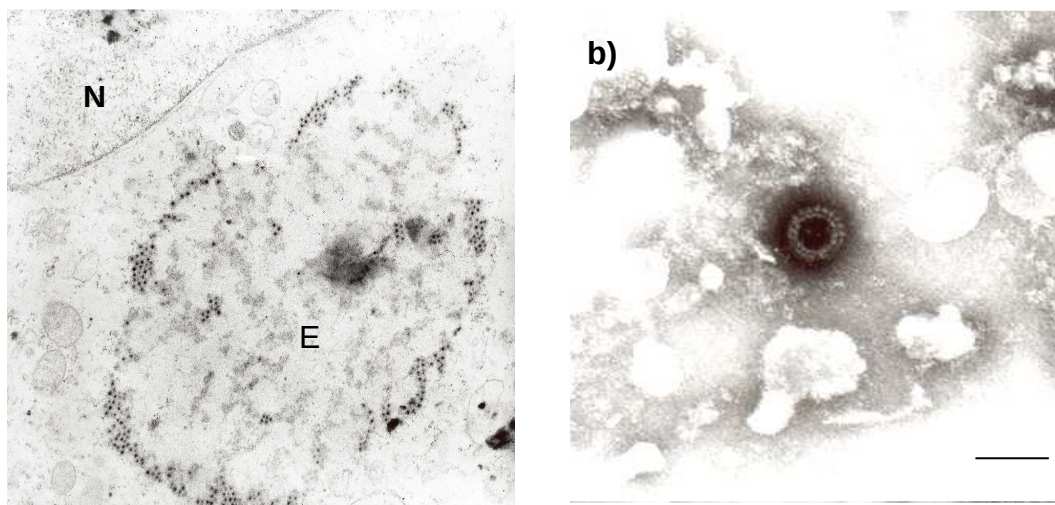
VH2-Zellkulturen: a) 36 h nach der Infektion mit dem Zellkulturüberstand des Isolates I14, Passage 4 mit einer KID_{50} von $20 \times 10^{4,5}$, MOI: 0,26 ungefärbt. Pfeil: mehrkernige Riesenzellen (Synzytien), 10er Objektiv; b) Pfeil: mehrkernige Riesenzelle (Synzytium), ungefärbt, 20er Objektiv; c) nach der H&E-Färbung werden die Zellgrenzen sichtbar (dünner Pfeil) und die Einschlusskörper (dicker Pfeil) eosinophil angefärbt, 100er Objektiv; d) nach der Giemsa-Färbung werden die Zellgrenzen sichtbar (dünner Pfeil) und die Einschlusskörper (dicker Pfeil) amphophil angefärbt, 100er Objektiv.

VH2-Kontrollkultur; e) & f) auch bei uninfizierten VH2-Zellen können vereinzelt Riesenzellen beobachtet werden (Pfeil), 10er Objektiv, ungefärbt f) 20er Objektiv, ungefärbt; g) mit der H&E-Färbung kann die hohe Zellteilungsaktivität (Pfeil) in uninfizierten VH2-Zellkulturen veranschaulicht werden; 100er Objektiv; h) mit der Giemsa-Färbung kann die hohe Zellteilungsaktivität (Pfeile: Mitosen) in uninfizierten VH2-Zellkulturen veranschaulicht werden; 100er Objektiv.

3.2.3.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung infizierter Zellkulturen

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden in Synzytien befindliche intrazytoplasmatische Einschlüsse gefunden. Diese lagen meist in der Nähe eines Kernes, zum Teil lagen sie aber auch ohne festen Ortsbezug im Zytoplasma der infizierten Zelle. Innerhalb der Einschlüsse, vor allem in deren Peripherie, wurden reife Viruspartikel beobachtet. Im Zellkulturüberstand infizierter Zellkulturen konnten Viruspartikel mit typischer Reovirus-Morphologie dargestellt werden.

Abb. 7: TEM-Untersuchung



a) Transmissionselektronenmikroskopisches Bild von einer VH2-Zelle, infiziert mit dem Reisolat aus der Leber des Tieres I16, ca. 27 h nach der Infektion. Einschlusskörper (E) mit Viruspartikeln in der Peripherie in der Nähe des Nukleus (N)

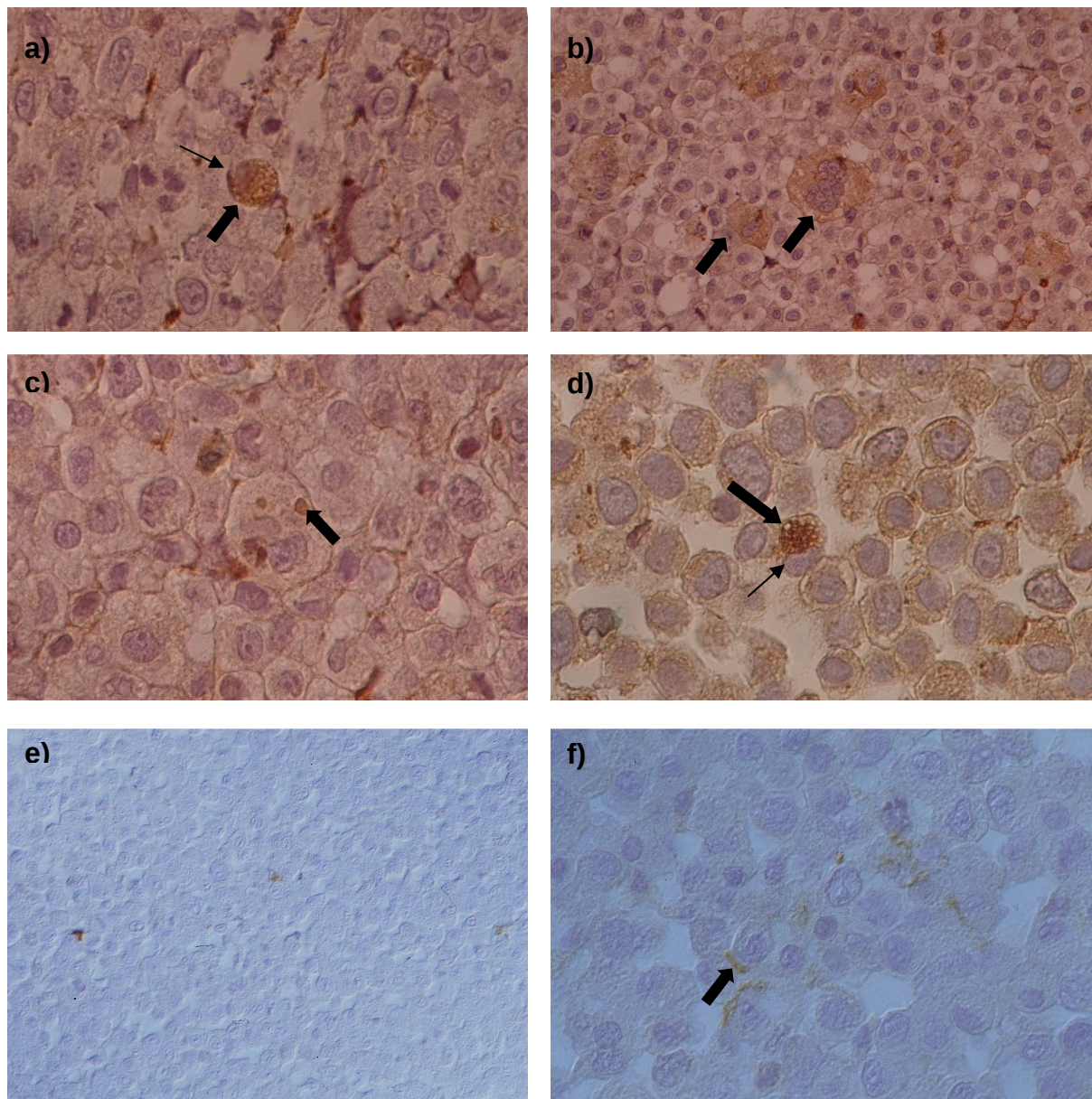
b) Viruspartikel aus dem Zellkulturüberstand einer mit dem Reisolat I16 infizierten VH2-Zellkultur ca. 27 h nach der Infektion (Balken: 60 nm).

3.2.4 Immunhistologische Untersuchung infizierter Zellkulturen

3.2.4.1 Immunhistologischer Nachweis von Reovirusantigenen in infizierten Zellkulturen

Die in Kaninchen produzierten Antikörper gegen das Ursprungsisolat IBD26/00 markierten in mit den Reisolaten infizierten VH2-Zellkulturen zum Einen die Einschlüsse. Zum Anderen zeigte sich eine im gesamten Zytoplasma verteilte granuläre positive Reaktion. Vereinzelt finden sich in VH2-Kontrollkulturen positive Reaktionen, diese liegen aber ausnahmslos extrazellulär (Abb. 8f).

Abb. 8: Immunhistologie



Immunhistologie von VH2-Zellkulturen nach Demaskierung mit Citratpuffer pH 6,0, PAP-Methode, gefärbt mit DAB und gegengefärbt mit Papanicolaou; a) Ursprungsisolat IBD26/00, zu erkennen ist eine grobgranuläre, im gesamten Zytoplasma vorhandene Reaktion (dicker Pfeil), der Nukleus ist an den Zellrand gedrängt (dünner Pfeil), 100er Objektiv; b) Isolat aus der Leber des infizierten Tieres I14, mehrere mehrkernige Riesenzellen zeigen eine grobgranuläre, diffuse, im gesamten Zytoplasma verteilte Reaktion (Pfeil) 40er Objektiv; c) Isolat aus der Leber des Tieres I14, die in der Histologie und Elektronenmikroskopie beschriebenen intrazytoplasmatisch Einschlüsse zeigen eine besonders deutliche Reaktion (Pfeil), 100er Objektiv; d) Isolat aus der Leber des Kontrolltieres K2, zu erkennen ist eine grobgranuläre, im gesamten Zytoplasma vorhandene Reaktion (dicker Pfeil), der Nukleus ist an den Zellrand gedrängt (dünner Pfeil), 100er Objektiv; e) VH2-Kontrollkultur ca. 90 h nach der Scheininokulation mit BME, 40er Objektiv; f) auch mit dem 100er Objektiv können nur extrazellulär liegende Bindungen des Antikörpers beobachtet werden (Pfeil).

3.2.4.2 Immunhistologischer Nachweis von Zytokeratin

Der Antikörper gegen Zytokeratin bindet spezifisch an epithelialen Zellen der *Boa constrictor* S1979/00. Sowohl die intrazytoplasmatischen Einschlüsse der Schlange S1979/00 als auch die in den mit den Isolaten und Reisolaten infizierten VH2-Zellkulturen stellen sich Zytokeratin-negativ dar.

3.2.4.3 Immunhistologischer Nachweis von Vimentin

Der Antikörper gegen Vimentin bindet in der *Boa constrictor* S1979/00 spezifisch an mesenchymalen Zellen, aber auch an einzelne epitheliale Zellen, wie an Tubuli der Niere und den Belegzellen des Magens. Sowohl die intrazytoplasmatischen Einschlüsse der Schlange S1979/00 als auch die in den mit den Isolaten und Reisolaten infizierten VH2-Zellkulturen stellen sich Vimentin-negativ dar.

Während in nichtinfizierten VH2-Zellkulturen alle Zellen Vimentin-positiv waren stellten sich in den infizierten Zellkulturen nur vereinzelte Zellen als Vimentin-positiv dar.

3.2.4.4 Immunhistologischer Nachweis von Aktin

Der Antikörper gegen Aktin bindet spezifisch an alle Zellen, in unterschiedlicher Intensität, in der *Boa constrictor* S1979/00. Die intrazytoplasmatischen Einschlüsse der Schlange S1979/00 stellen sich Aktin-negativ dar, während die in den mit den Isolaten und Reisolaten infizierten VH2-Zellkulturen Aktin-positiv sind.

3.2.4.5 Immunhistologischer Nachweis von Desmin

Der Antikörper gegen Desmin bindet spezifisch an Muskelzellen in der *Boa constrictor* S1979/00. Sowohl die intrazytoplasmatischen Einschlüsse der Schlange S1979/00 als auch die in den mit den Isolaten und Reisolaten infizierten VH2-Zellkulturen stellen sich Desmin-negativ dar.

3.2.4.6 Immunhistologischer Nachweis von Neurofilament

Der Antikörper gegen Neurofilamente bindet spezifisch an Axone der *Boa constrictor* S1979/00. Sowohl die intrazytoplasmatischen Einschlüsse der Schlange S1979/00 als auch die in den mit den Isolaten und Reisolaten infizierten VH2-Zellkulturen stellen sich Neurofilament-negativ dar.

3.2.5 Immunhistologischer Nachweis von Reovirusantigenen im Organschnitt

Mittels der getesteten Methoden, Demaskierung mit Citratpuffer pH 6,0, TUF®, Trypsin und Protease sowie mit der zur Verstärkung der Signale eingesetzten PAP; Avidin-Biotin-Komplex (ABC), Avidin-Biotin-Komplex-Elite-Kit, Streptavidin mit und ohne Tyraminverstärkung, konnte keine spezifische Reaktion festgestellt werden.

3.2.6 Negative staining der Kotproben

In keiner der untersuchten Kotproben konnte mittels des angewandten elektronenmikroskopischen Verfahrens Viruspartikel nachgewiesen werden.

3.2.7 Zusammenfassung der virologischen Befunde

Tab. 12: Zusammenfassung der virologischen Ergebnisse

		positive Organe auf VH2- Zellkulturen	Synzytien in der Zell-kultur	Gen- segmente	AK Kan- α - IBD26/00 Bindung	Ein- schluss- körper- bildung	Chloro- form- stabil
6 Wo p.i.	I1	vitale	ja	10	positiv	ja	ja
		Leberzellen,					
		vitale	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
		Nierenzellen,					
	I17	Leberhomogenat,	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
		Kl.-tupfer vom 14.05.02 (25/02)	ja	10	positiv	ja	ja
12 Wo p.i.	I3	vitale	ja	10	positiv	ja	ja
		Leberzellen,					
		vitale	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
		Nierenzellen,					
	I14	Leber- homogenisat	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
		vitale	ja	10	positiv	ja	ja
	I14	Leberzellen,					
		vitale	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
		Nierenzellen,					
		Leber- homogenisat	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.

Legende auf Seite 72

Tab. 12 (Fortsetzung):

		positive Organe auf VH2- Zellkulturen	Synzytien in der Zell-kultur	Gen- segmente	AK Kan- α - IBD26/00 Bindung	Ein- schluss- körper- bildung	Chloro- form- stabil
18 Wo p.i.	K2	vitale	ja	10	positiv	ja	ja
		Leberzellen, vitale Nierenzellen	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	I4	vitale	ja	10	positiv	ja	ja
		Leberzellen, vitale Nierenzellen	ja	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
	I16	vitale	ja	10	positiv	ja	ja
		Leberzellen	ja	10	positiv	ja	ja

n.u.: nicht untersucht; Kl.-Tupfer: Kloakentupfer

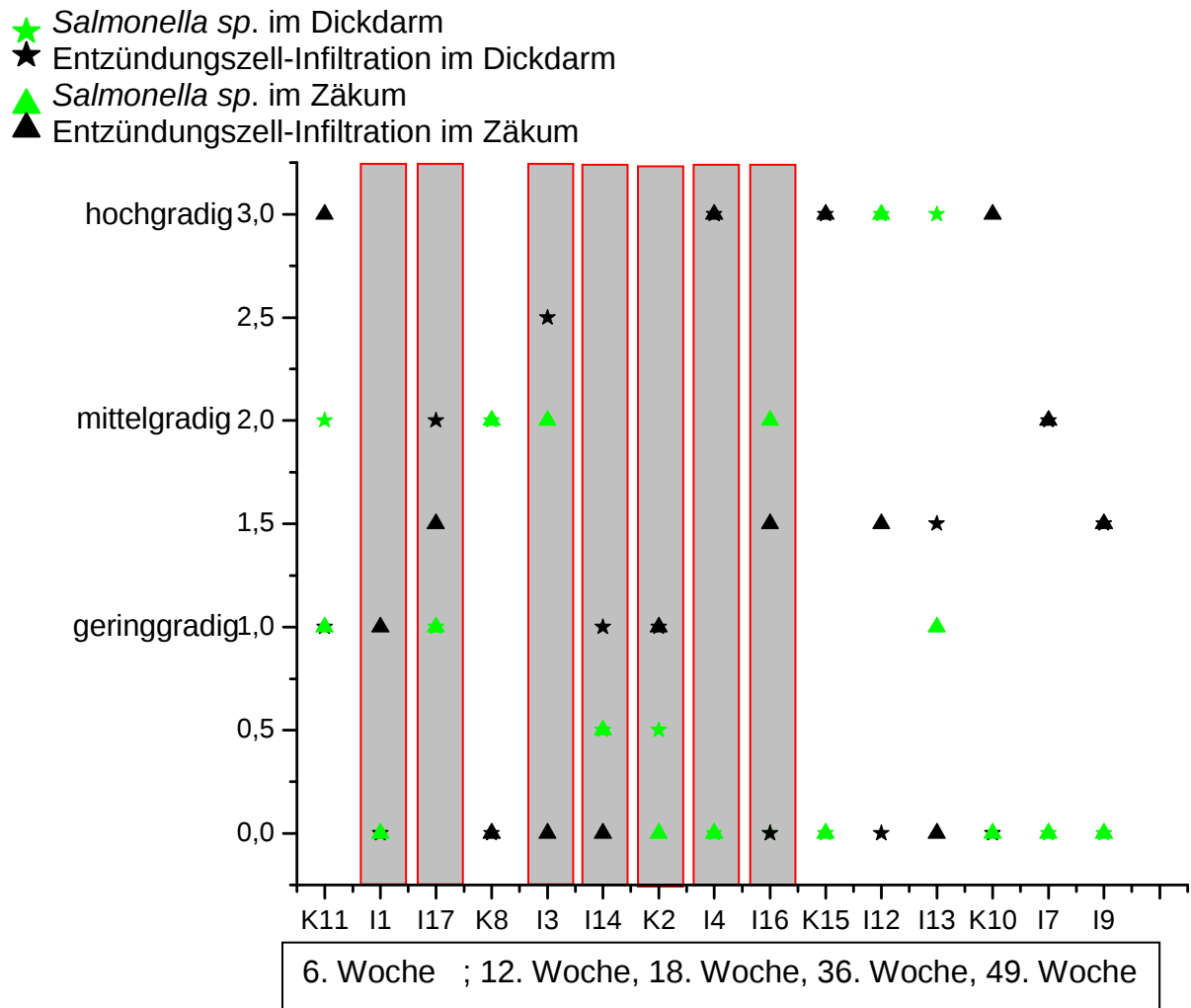
Nach der 18. Woche wurde aus keiner der untersuchten Proben Virus isoliert.

3.2.8 Bakteriologische Untersuchung

Da eine Vielzahl an apathogen und obligat pathogenen Keimen während des Versuches isoliert wurden, sind die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung im Anhang tabellarisch aufgeführt (Tab. 24)

Im folgenden Diagramm ist die Infiltration mit Entzündungszellen und der Nachweis von *Salmonellen sp.* vergleichend dargestellt. Die mit einem grauen Kasten hinterlegten Bereiche heben die virologisch positiven Tiere hervor.

Grafik 5: Vergleichende Darstellung der Entzündungszell-Infiltration und des Nachweises von Salmonellen



K: Tier aus der Kontrollgruppe mit individueller Nummer; I: Tier aus der Gruppe der infizierten Tiere mit individueller Nummer; grau-hinterlegte Bereiche stellen die virologisch positiven Tiere heraus.

Anhand dieser Grafik wird deutlich, dass die bei der bakteriologischen Untersuchung gefundenen Salmonellen in keinem direkten Zusammenhang mit der Entzündungszell-Infiltration in den untersuchten Darmabschnitten stehen.

Anhand der grauen Hinterlegung der virologisch positiven Tiere kann zudem gezeigt werden, dass keine Korrelation zwischen der Entzündungszell-Infiltration in das Darmgewebe mit dem virologischen Befund besteht. Auch zwischen Salmonellennachweis und Virusnachweis ist kein Zusammenhang zu erkennen.

3.2.9 Parasitologische Untersuchung

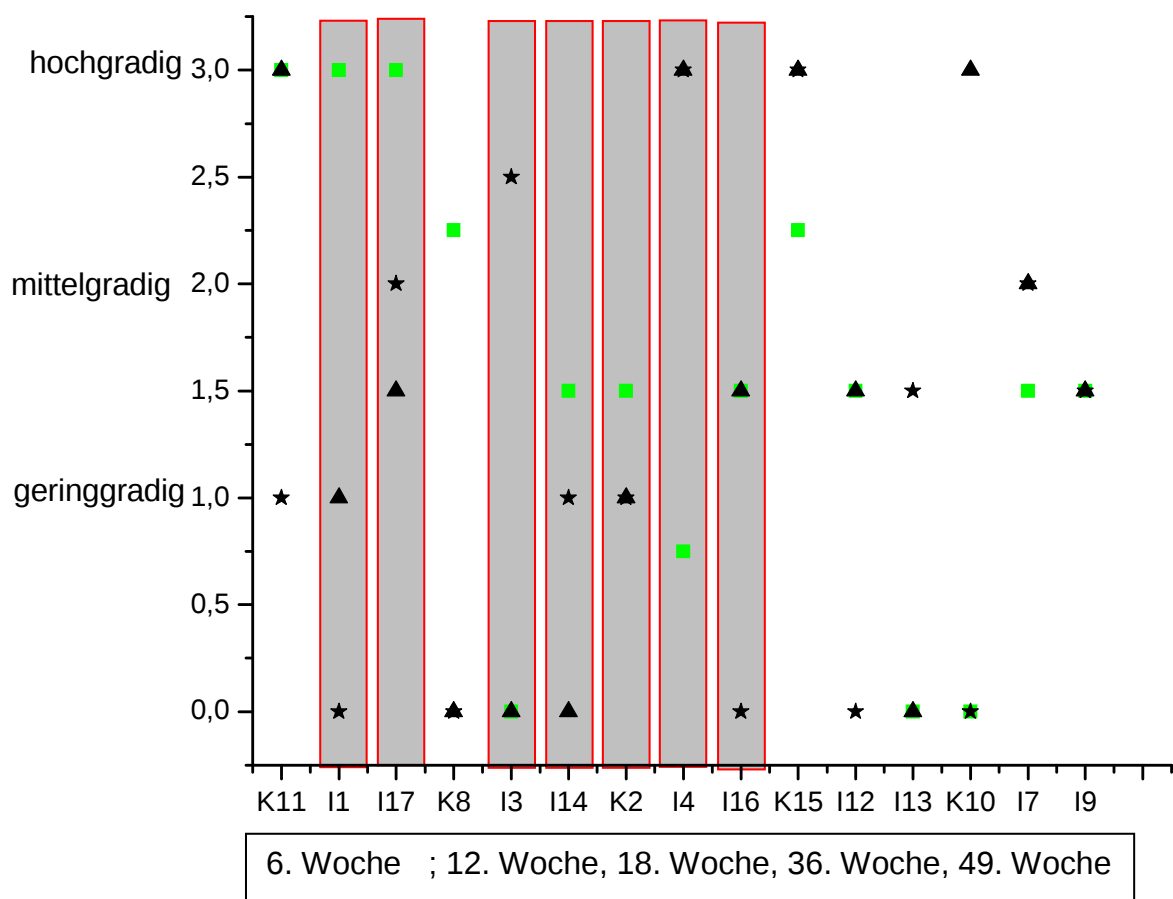
Im folgenden Diagramm ist die Infiltration mit Entzündungszellen und der Nachweis von *Entamoeba*-Zysten zusammengefasst.

Grafik 6: Vergleichende Darstellung der Entzündungszell-Infiltration und des Nachweises von *Entamoeba* sp.

■ *Entamoeba* sp.-Zysten

★ Entzündungszell- Infiltration im Dickdarm

▲ Entzündungszell-Infiltration im Zäkum



K: Tier aus der Kontrollgruppe mit individueller Nummer; I: Tier aus der Gruppe der infizierten Tiere mit individueller Nummer; grau-hinterlegte Bereiche stellen die virologisch positiven Tiere heraus.

Anhand dieser Grafik wird deutlich, dass die bei der parasitologischen Untersuchung gefundenen *Entamoeba* sp. in keinem direkten Zusammenhang mit der Entzündungszell-Infiltration in den untersuchten Darmabschnitten oder der Virusinfektion stehen.

4. Diskussion

Reptilien sind wechselwarme Tiere, deren Stoffwechsel stark von der sie umgebenden Temperatur abhängig ist. In der Literatur wird die optimale Haltungstemperatur für *Boa constrictor* mit 26-32 °C angegeben (BINDER, 2002; DREWNOSKI, 1996).

Der Mittelwert der täglich gemessenen Umgebungstemperatur der Versuchsschlangen zeigte über die Dauer des Versuches eine Abweichung zwischen den beiden Tierversuchsgruppen von 0,1 °C. Es existieren keine Daten über die Zuwachsraten bei Riesenschlangen in verschiedenen Temperaturbereichen. Da die Abweichung beider Gruppen im Verhältnis zur relativ weit angegebenen optimalen Haltungstemperatur sehr gering ist, scheint es unwahrscheinlich, dass sie für die verminderte Gewichtszunahme der infizierten Schlangen verantwortlich ist. Der Mittelwert der Umgebungstemperatur der Kontrolltiergruppe betrug 26,6 °C und jener der Infizierten 26,5 °C.

Auch die Abweichung der relativen Luftfeuchtigkeit von 1,3 % kann als Ursache der unterschiedlichen Gewichtsentwicklung ausgeschlossen werden. In beiden Gruppen war die Luftfeuchtigkeit mit 50,8 % bei den Kontrolltieren und mit 52,1 % bei den infizierten Tieren niedriger als die in der Literatur für *Boa constrictor* angegebenen Optimal-Werte. Es wird eine Luftfeuchtigkeit von 60-75 % als wünschenswert angegeben (BINDER, 2002; DREWNOSKI, 1996). Sie konnte aber aus baulichen Gründen in diesem Experiment nicht erreicht werden.

Bei Hühnern kann die Infektion mit verschiedenen Reovirusstämmen zu einer verminderten Gewichtszunahme führen. Bei der gleichzeitigen Infektion mit Kokzidien kann ein deutlicherer Unterschied in der Gewichtsentwicklung der mit Reoviren infizierten und der nichtinfizierten Kontrollgruppe beobachtet werden (RUFF und ROSENBERGER, 1984).

GUY et al., (1988) konnten eine verminderte Gewichtszunahme bei Hühnern feststellen, welche mit dem Reovirus 2408 infiziert wurden, ohne pathohistologische Veränderungen im Darm zu finden. Der Darminhalt der von ihnen seziierten Tiere stellt sich grobzerkleinert und schlecht verdaut dar.

Da sich nicht in allen am Malabsorptionssyndrom leidenden Hühner eine pathohistologische Veränderung des Darms zeigt (PAGE et al., 1980), kann darüber spekuliert werden, ob die *in vitro* beobachtete Hemmung der zelleigenen

Proteinsynthese (TYLER et al., 1996) in den Darmzellen der mit Reoviren infizierten Tiere eine Verminderung der Enzymproduktion bewirkt.

Auch bei den in diesem Versuch untersuchten Schlangen wurde, über einen Zeitraum von 6 Monaten, eine verminderte Gewichtszunahme im Vergleich zur uninfizierten Kontrollgruppe festgestellt. Da auch hier keine spezifischen pathohistologischen Befunde im Darm erhoben werden konnten, bleibt die Frage offen, ob es zu einer Mindersynthese von für die Verdauung benötigten Proteinen kam.

Die Ursache der erhöhten Zahl apoptotischer Zellen im Darmepithel der Tiere I4 und K11 kann weder mit der Reovirusinfektion in Verbindung gebracht werden noch mit der Amöbeninfektion oder den isolierten Salmonellen (Grafik 5 und 6). In der Literatur sind histologische Veränderungen bei der Reovirus-assoziierten Enteritis der Broiler in Form einer geringgradigen Villusatrophie sowie einer Kryptendilatation beschrieben. In den dilatierten Krypten wurden nekrotische Epithelzellen und verschiedene Entzündungszellen gefunden. Die Submukosa zeigte eine Infiltration mit Makrophagen, Lymphozyten und heterophilen Granulozyten. Die Kryptepithelzellen enthielten intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörper, welche sich elektronenmikroskopisch als Reovirusagglomerationen darstellten (GOODWIN et al., 1993).

Führen Salmonellen oder Amöben bei Reptilien zu pathologischen Veränderungen des Darms, so wird von diphtheroid-nekrotisierenden Kolitiden und Typhlokolitiden berichtet. Vor allem *Entamoeba invadens* kann bei Schlangen zu hochgradigen Veränderungen mit pseudomembranösen Auflagerungen führen. Sowohl Salmonellen als auch *Entamoeba invadens* können in das Leberparenchym einwandern und dort entzündliche Veränderungen hervorrufen (JAROFGE und LANGE, 1993; KOJIMOTO et al., 2001; ONDERKA und FINLAYSON, 1984). Der Vergleich der pathohistologischen Veränderungen mit den Ergebnissen der bakteriologischen und parasitologischen Untersuchung der einzelnen Individuen spricht gegen einen direkten Zusammenhang zwischen diesen Infektionen und den Veränderungen in der Leber und im Dünndarm. Auch eine direkte Beziehung zwischen der experimentell gesetzten Infektion und dem Nachweis von Salmonellen oder Entamöben ist nicht feststellbar.

Lebernekrosen in verschiedenen Ausprägungsformen stellen einen weit verbreiteten pathohistologischen Befund bei aviären Reovirusinfektionen dar (ISLAM et al., 1988;

NI und KEMP, 1995; MANDELLI et al., 1978; TANG et al., 1987 a und b; WAGES und FICKEN, 1989).

Da alle diagnostizierten pathohistologischen Veränderungen in diesem Versuch im Leberparenchym infizierter Schlangen und virologisch positiver Lebern innerhalb der ersten 12 Wochen nach der Infektion auftraten, wird davon ausgegangen, dass die Entzündungszell-Infiltration auf die Infektion mit dem Orthoreovirus IBD26/00 zurückzuführen ist. Ob es kurz nach der Infektion zur Bildung von hepatozellulären Synzytien gekommen ist, kann nicht nachvollzogen werden. In verschiedenen Infektionsversuchen mit aviären Reoviren ist diese schon kurz nach der Infektion beschrieben (WAGES und FICKEN, 1989; MANDELLI et al., 1978), während ISLAM et al. (1988) nur von Riesenzellen in der Peripherie von Lebernekrosen berichtet.

MANDELLI et al. (1978) beobachteten am zweiten Tag nach der Infektion von Eintagsküken mit einem aviären Reovirus von polynukleären Hepatozyten. Sie konnten diese schon 6 Tage nach der Infektion nicht mehr nachweisen. Die Nekroseareale wurden in diesem Stadium der Entzündung von einer gemischtzelligen Infiltration abgegrenzt.

Da aufgrund der Fragestellung die histologischen Untersuchungen der in dieser Dissertation untersuchten Schlangen erst sechs Wochen nach der Infektion begann, ist es möglich, dass nur die Spätfolgen der Infektion mit IBD26/00 beobachtet werden konnten. Kommt es nur zu vereinzelt, kleinen Nekrosearealen, kann das Lebergewebe durch Regeneration ersetzt werden und es bleibt kein Narbengewebe zurück.

Eine Regeneration und Proliferation von Hepatozyten und Gallengangszellen konnten MANDELLI et al. (1978) schon fünf Tage nach der Infektion mit aviären Reoviren beobachten.

ISLAM et al. (1988) konnten pathohistologische Veränderungen der Leber bis zum Versuchende (fünf Wochen *post infectionem*) bei mit Reoviren infizierten Hühnern nachweisen.

Die von LAMIRANDE et al. (1999) beschriebenen Lungenveränderungen nach der experimentellen Infektion einer schwarzen Erdnatter *Elaphe obsoleta obsoleta* mit dem Elaphe-Reovirus wurden von uns nicht beobachtet.

Das Virusisolat IBD26/00 konnte nach oraler, trachealer und peritonealer Applikation von 60×10^6 KID₅₀ aus den infizierten Tieren über 18 Wochen nachgewiesen werden.

Die genauen Schritte der Virusvermehrung und -ausbreitung von IBD26/00 konnten nicht geklärt werden. Dass auch Wochen nach der Infektion aus Leber, Niere und Knochenmark das Virus isoliert wurde, spricht jedoch für eine Vermehrung und Ausbreitung in den infizierten Tieren.

Die weiteren histologischen Veränderungen wurden als unspezifisch gewertet und sind im Anhang zusammengefasst.

Das Kontrolltier der dritten Gruppe, welches nach 18 Wochen euthanasiert wurde, war bei der virologischen Untersuchung von Leber und Niere positiv. Das aus dem Kontrolltier isolierte Virus zeigt eine stark herabgesetzte Vermehrungsrate in VH2-Zellkulturen. Der Übertragungsweg, über welchen sich die Schlange K2 mit dem Reovirus infiziert hat, kann nicht geklärt werden. Die Tiere wurden in zwei separaten Räumen aufgestellt. Zwar wurden Flur und Waschbecken vom Pflegepersonal gemeinsam genutzt, die Räume der Tiere wurden aber nur mit Schutzkleidung betreten.

Es wäre denkbar dass das positive Kontrolltier schon vor Beginn des Versuchs mit dem gleichen oder einem sehr nahe Verwandten Orthoreovirus infiziert war und wie die später infizierten Tiere keine Krankheitssymptome entwickelte. Dass nicht unterscheidbare Reovirusisolate in verschiedenen Beständen vorkommen können, ist durch unsere beiden Ausgangsisolate belegt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die Proben während der Virusanzüchtung im Labor kontaminiert wurden. Letzten Endes kann aber eine Übertragung während des Versuchs trotz aller Vorsichtsmaßnahmen nicht ausgeschlossen werden.

Mittels der Polyacrylamid-Gelelektrophorese konnten die 10 Gensegmente mit Ihrer Unterteilung in verschiedene Größen dargestellt werden. Die typischen drei großen, drei mittleren und vier kleinen Gensegmente zeigen zusammen mit den Veränderungen in der Zellkultur und den im Zellkulturüberstand gefundenen Viruspartikeln das Vorliegen eines Orthoreovirus. Die Isolierung und die Darstellung der aufgetrennten Gensegmente hat gezeigt, dass die Gensegmente des Ursprungsisolates und die der reisolierten Viren das gleiche Wanderungsmuster aufweisen. Da Reptilien-Reoviren eine enorme Heterogenität aufweisen (BLAHAK et al., 1995), kann davon ausgegangen werden, dass alle isolierten und weiter charakterisierten Orthoreoviren mit dem Ursprungsisolat identisch sind oder in einer sehr engen Verwandtschaft stehen. Selbst Reptilien-Reoviren eines Serotypen

können geringgradige Abweichungen im Wanderungsmuster zeigten BLAHAK et al. (1995).

Das Wanderungsmuster der Gensegmente des isolierten Virus zeigt ein bislang nicht publiziertes Orthoreovirus. Dass die Isolate aus dem Kontrolltier K2 und dem infizierten Tier I4, auch nach mehrmaliger Präparation der viralen Gensegmente, Banden geringer Intensität einzelner Gensegmente zeigt, kann verschiedene Ursachen haben.

Das Kontrolltier K2 zeigte eine schwache Bande des Gensegmentes L2.

Das vom Gensegment L2 kodierte Protein der inneren Schale, das Spikeprotein $\lambda 2$, katalysiert den Prozess der mRNS Bekappung (BUJNICKI und RYCHLEWSKI, 2001). Untersuchungen an einzelnen MRV zeigten, dass es durch hohe Zellkultur-Passagen zur Deletion dieses Gensegmentes kommen kann. Es werden defekte Viren produziert, welchen das L2-Segment fehlt. Diese Viren haben die Fähigkeit zur Entwicklung einer persistenten Infektion in der Zellkultur (BROWN et al., 1983). Auch MORRISON et al. (1993) konnten durch zahlreiche Zellkultur-Passagen einen weniger virulenten Reovirusstamm züchten, der zu einer verlängerten Verweildauer in infizierten Mäusen führte.

Durch die Passage einer der infizierten Schlangen könnte es bereits zu einer Deletion des L2-Segmentes gekommen sein und die durch Kontamination infizierte Schlange K2 wäre mit einem defekten Virus infiziert worden. Wie schon BROWN et al. (1983) berichtet haben, konnte auch in diesen Untersuchungen eine deutlich geringere KID_{50} in der Zellkultur gemessen werden.

Das infizierte Tier I4 zeigte eine schwache Bande des M1 Gensegments. Auch nach mehrmaliger RNS-Reinigung konnte es nicht deutlich dargestellt werden. Dieses Gensegment kodiert für das kleine Strukturprotein $\mu 2$ (WIENER et al., 1988). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass dieses Protein an der Bildung der intrazytoplasmatischen Einschlüsse beteiligt ist (BECKER et al., 2001; BROERING et al., 2002; MBISA et al., 2000). Obwohl das 736 Basenpaar lange Gensegment bei T3D und T1L gut konserviert ist (BRENTANO et al., 1998), ist es für die unterschiedliche Gestaltung der Einschlüsse der beiden Säugetier-Reovirusstämme verantwortlich.

Die unbeeinflusste Vermehrung des Reisolates I4 mit einer sehr schwachen Expression des M1 Gensegmentes widerspricht den Ergebnissen der an T3D und T1L unternommenen Untersuchungen von ZOU und BROWN (1992). In diesen

Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Gensegment M1 für die Replikation der MRV benötigt wird. Das Reisolat I4 zeigte keine verzögerte Vermehrung in der Zellkultur. Auch konnte mittels der verwendeten Methoden keine Differenz in der Morphologie und der Geschwindigkeit der Einschlusskörperbildung beobachtet werden. Es ist anzunehmen, dass das Gensegment M1 bei Reptilien-Reoviren keine zentrale Rolle im Vermehrungszyklus spielt.

Durch die zwei verschiedenen Verfahren zur Virusanreicherung in VH2-Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass das Routineverfahren zur Detektion von Reoviren in Reptiliengewebe zu falsch-negativen Ergebnissen führen kann. Mittels der Co-Infektion von VH2-Zellen mit vereinzelt vitalen Zellen aus Leber und Niere konnte eine erhöhte Sicherheit in der Auffindung der Viren erreicht werden.

Die in der Zellkultur der Vipernherz-Zellen entstandenen Synzytien und der Verlust der Adhärenz werden in der Literatur häufig bei Orthoreovirusisolaten aus Reptilien beschrieben (AHNE et al., 1987; BLAHAK et al., 1995; LAMIRANDE et al., 1999; MARSCHANG, 2000; Ott, 2000; VIELER et al., 1994).

LAMIRANDE et al. (1999) konnten elektronenmikroskopisch keine intrazytoplasmatischen Einschlüsse in den infizierten VH2-Zellkulturen nachweisen. Auch AHNE et al. (1987) konnten mittels der Giemsa-Färbung infizierter *Iguana Heart cells* (IgH 2)-Zellen keine intrazytoplasmatischen Einschlüsse finden. Die Färbung mit Acridin-Orange brachte aber grüne intrazytoplasmatische Einschlüsse zu Tage, was für das Vorliegen von RNS in den Einschlüssen spricht. Die anderen bisher isolierten Orthoreoviren aus Reptilien wurden nicht auf die Bildung von Einschlusskörpern in der Zellkultur untersucht.

Das Färbeverhalten der hier untersuchten Einschlüsse in der Lichtmikroskopie spricht für das Vorliegen von basischen Strukturen. Eosin ist ein saurer Farbstoff, der sich an basische, azidophile Strukturen heftet und diese mit seiner roten Farbe markiert. Die violette Farbe in der Giemsa-Färbung zeigt ebenfalls eine Azidophilie der Einschlüsse.

GOODWIN et al. (1993) berichteten als einzigen von der Bildung intrazytoplasmatischer Einschlüsse *in vivo* im Zusammenhang mit einer Reovirusinfektion. Sie beschrieben intrazytoplasmatische eosinophile Einschlüsse in degenerierten Kryptepithelzellen bei Hühnern. Von anderen Autoren wurde im Zusammenhang mit Reovirusinfektionen nur die Bildung von Einschlüssen in der

Zellkultur beschrieben (ANDERSON, 1966; BECKER et al., 2001; GOMATOS, 1962; LELAND et al., 2000; RHIM et al., 1962).

Bei der histologischen Untersuchung des Tieres S1979/00 wurden in einer Vielzahl von Organen intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörper gefunden, die jedoch nach experimenteller Infektion nur in der Zellkultur reproduziert werden konnten. Da die Bildung der Einschlüsse nach Zellkulturpassage und anschließender Infektion der Versuchsschlangen nicht erfolgte, ist ein Zusammenhang zwischen der Infektion mit dem Virus IBD26/00 und der Einschlusskörperchenerkrankung der Riesenschlangen fraglich. Auch zeigten die experimentell infizierten Schlangen keine der IBD entsprechende klinische Symptomatik.

Es kann spekuliert werden, ob jüngere oder immunsupprimierte Tiere eine stärkere Ausprägung der beobachteten Befunde gezeigt hätten oder sogar erkrankt wären.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Zellkulturen verifizierte den schon lichtmikroskopisch erhobenen Verdacht der Bildung von Reovirus-assoziierten Einschlusskörpern. Zusammen mit den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchung lässt sich sagen, dass die in der Zellkultur gebildeten Einschlüsse aus Aktin bestehen und in ihrer Peripherie Reoviruspartikel liegen.

Reoviren bilden Einschlüsse deren Grundsubstanz sowohl Intermediärfilamente (SHARP et al., 1982) als auch abgelagerter RNS (GOMATOS et al., 1962; RHIM et al., 1962; TAKEHARA et al., 1989) oder Proteine (RHIM et al., 1962) enthalten können. Dass die beobachteten Einschlüsse nur aus agglomerierten Virionen bestehen, kann ausgeschlossen werden, da nur in der Peripherie der Gebilde Virionen beobachtet wurden.

Die gegen das Ursprungsisolat hergestellten Antikörper binden nur in mit dem Orthoreovirus IBD26/00 infizierten VH2-Zellkulturen, das Prä-Immunserum der Kaninchen zeigt keine Bindung zu infizierten oder scheininfizierten VH2-Zellen. Aufgrund dieser Beobachtung wird der Antikörper Kaninchen- α -IBD26/00 als spezifisch für IBD26/00 angesehen.

Dabei wurden die für Reovirusinfektionen typische granuläre Reaktion der Antigen enthaltenden Zellen (TANG und FLECHER, 1987) beobachtet. Auch die intrazytoplasmatischen Einschlüsse, welche RNS (TAKEHARA et al., 1989; RHIM et al., 1962), aber auch ganze Viruspartikel, enthalten (WILCOX et al., 1982; GOMATOS et al., 1962; DANIS et al., 1993), oder aus verschiedenen Virusproteinen bestehen können, (RHIM et al., 1962) zeigten eine positive Reaktion. Die in der

negativ-Kontrolle der VH2-Zellen gefundenen Anfärbungen liegen ausnahmslos extrazellulär und werden als eine unspezifische Reaktion des Antikörpers erachtet.

Bei der virologischen Untersuchung der Organe konnte vermehrungsfähiges Virus nachgewiesen werden. Das Fehlschlagen der immunhistologischen Darstellung des Reovirusantigens in den virologisch positiven Organen kann zum Einen an der Quantität der Viren in den betroffenen Zellen, zum Anderen an der Anwendung nicht geeigneter immunhistologischer Methoden liegen. Die Zellkulturen wurden sieben Tage in Formalin fixiert, während die Organe der Schlangen Monate, im Fall der Schlange von der das Ursprungsisolat stammt sogar Jahre, in Formalin fixiert waren. In keinem der Organe von Reovirus 176 infizierten Eintagsküken konnten TANG und FLECHER (1987) Virusantigen nach dem 20. Tag *post infectionem* nachweisen.

Da die bisher beschriebenen, von Reoviren hervorgerufenen Symptome meist akut sind (GUY et al., 1988; HIERONYMUS et al., 1982; MANN et al., 2002; MANDELLI et al., 1978; MORIN et al., 1996; NI und KEMP, 1995; RUFF und ROSENBERG, 1984; TANG et al., 1987a und b; WAGES und FICKEN, 1989), ist es möglich, dass die akute Vermehrungsphase sechs Wochen nach der Infektion abgeschlossen ist. ISLAM et al. (1988) beobachteten, dass nach der Injektion mit einem aviären Reovirusstamm in die Fußsohle die pathologischen Veränderungen in den Gelenken der Versuchshühner bis zum Ende des Versuches nach fünf Wochen zunahmen. Dahingegen gelang die Reisolierung zum Ende des Versuches immer seltener, beziehungsweise erwies sich als schwierig. Die Autoren spekulieren, dass die virale Arthritis der Hühner auf die Bildung autoimmuner Antikörper als Reaktion auf die virale Infektion zu sehen ist.

Der sich aus der Fragestellung ergebene Zeitpunkt für die erste immunhistologischen Untersuchung unserer Proben sechs Wochen nach der Infektion kann für die Darstellung des Reovirusantigens in infizierten Zellen zu spät gewesen sein.

Die Einschlüsse in den infizierten Zellkulturen konnten mittels der Immunhistologie von denen im Tier S1979/00 beobachteten Einschlüsse differenziert werden. Zwar zeigten beide intrazytoplasmatische Einschlüsse das gleiche Färbeverhalten in der H&E- sowie in der Giemsa-Färbung, jedoch wurde gezeigt, dass die Einschlüsse der an IBD erkrankten Schlange S1979/00 Aktin-negativ waren während die in der Zellkultur vom Isolat und den Reisolaten gebildeten Einschlüsse sich Aktin-positiv darstellten.

Während uninfizierte VH2-Zellen Vimentin-positiv waren, fand man in den infizierten Zellkulturen nur vereinzelt Vimentin-positive Zellen. Es wurde schon von SHARPE et al. (1982) eine Zerstörung der Vimentinstruktur in T1L-infizierten *Afrikan green monkey kidney*-Zellen beobachtet. Sie fanden, dass die physiologische Vimentinstruktur aufgelöst war und die Vimentinfilamente ohne Ausrichtung im Zytoplasma lagen. In dieser von SHARPE et al. (1982) durchgeführten Untersuchung stellten sich die Einschlüsse Vimentin-positiv und Aktin-negativ dar.

Es kann nur vermutet werden, dass es durch die Infektion mit dem Isolat IBD26/00 und mit den Reisolaten zu einer Aufhebung der Vimentinfilamentstruktur kam, welche dazu führte, dass der Antikörper nicht mehr an das Epitop binden konnte.

Aktin ist als Grundgerüst in jeder Zelle vorhanden, in der Schlange S1979/00 bindet der Antikörper an alle Zellen in verschiedener Intensität. Der Bereich der intrazytoplasmatischen Einschlüsse stellt sich allerdings negativ dar. In VH2-Zellkulturen bindet der Antikörper im gesamten Zytoplasma mit besonderer Intensität aber im Bereich der intrazytoplasmatischen Einschlüsse. Die intrazelluläre Aktin-Struktur wurde also in beiden Zellarten auf unterschiedliche Weise beeinflusst.

Es wurden Kotproben der experimentell infizierten und nicht infizierten Schlangen während der ersten vier Monate nach der Infektion untersucht. Es konnte in keiner der untersuchten Proben Viruspartikel nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stand nicht mit der Art der Infektion in Zusammenhang, da sowohl bei den oral als auch den nicht oral infizierten Tieren keine Ausscheidung nachgewiesen werden konnte. Da die Tiere in den ersten Tagen nach der Infektion keinen Kot abgesetzt haben, konnte allerdings kein Kot direkt nach der Infektion untersucht werden.

In den eigenen Untersuchungen wurden aus nahezu allen untersuchten Organen von zwei der drei untersuchten Schlangen in der ersten Versuchstiergruppe *Salmonellen* sp. isoliert. Die in der Literatur angegebenen pathohistologischen Veränderungen für eine Salmonellen-Septikämie (GAMBRE et al., 1980; ONDERKA und FINLAYSON, 1984) fehlten aber. Es konnte ebenfalls keine Korrelation der Entzündungszell-Infiltration ins Darmgewebe mit der Isolierung von Salmonellen gefunden werden. Aus diesem Grund, werden die in dieser Dissertation bei den Versuchsschlangen gefundenen Salmonellen als apathogen oder fakultativ pathogen angesehen.

Es muss davon ausgegangen werden, dass es sich um eine entnahmebedingte Kontamination der extraenteralen Organe handelt.

In den nachfolgenden Sektionen wurde vermehrt auf eine sterile Probenentnahme geachtet. Es wurden daraufhin *Salmonellen sp.* nur noch im Darmgewebe der untersuchten Tiere gefunden (Tab. 24).

Auch in der Gegenüberstellung der parasitologischen Befunde mit den histologischen Beobachtungen kann kein Zusammenhang zwischen beiden festgestellt werden. Es wurden in keiner der untersuchten Lebern Amöben nachgewiesen. Auch wenn in zwei der drei Tiere, welche eine gemischtzellige Infiltration im Leberparenchym aufwiesen, ein hochgradiger Befall mit *Entamoeba sp.* nachgewiesen wurde, ist das nicht eindeutig, da im Kontrolltier, welches ebenfalls an einem hochgradigen Befall mit diesen Einzellern litt, keine histologische Veränderung in der Leber gefunden wurde. Ebenso wie die Abwesenheit von pathohistologischen Veränderungen im Darm sprechen diese Befunde gegen das Vorliegen einer *Entamoeba invadens*-Infektion der Leber.

5. Zusammenfassung

1. Das Ziel dieser Arbeit war es, mittels der experimentellen Infektion von *Boa constrictor* die Pathogenität des Orthoreovirusisolates IBD26/00, das aus einer an IBD erkrankten *Boa constrictor* stammt, zu bestimmen.

2. Im ersten Teil der Literaturübersicht wird auf den gegenwärtigen Kenntnisstand bezüglich der Familie der Reoviren, insbesondere der Orthoreoviren, eingegangen. Der zweite Teil gibt einen Überblick über die verschiedenen durch Orthoreoviren verursachten Erkrankungen und deren Pathogenese.

3. Es wurden 10 juvenile *Boa constrictor* mit dem Orthoreovirusisolat IBD26/00 infiziert, 5 Tiere dienten als Kontrollen.

Über einen Zeitraum von 49 Wochen wurden die Tiere in Abständen euthanasiert und virologisch, histologisch, bakteriologisch und parasitologisch untersucht.

4. Bis zu 18 Wochen *post infectionem* wurde das Virus aus verschiedenen Organen aller infizierten Tiere reisoliert. Das Virus wurde auch aus einer Kontrollschlange isoliert. In den ersten Wochen nach der Infektion, zeigte die Gruppe der Kontrolltiere eine deutlich größere Gewichtszunahme als die Gruppe der infizierten Tiere.

5. Mittels der histologischen Untersuchung wurde in drei der virologisch positiven Schlangen aus der Gruppe der Infizierten eine gemischtzellige Infiltration des Leberparenchyms beobachtet. Dies wird als eine in Abheilung befindliche Veränderungen, welche durch die Infektion mit dem Reovirus IBD26/00 verursacht wurde, interpretiert.

6. Das Isolat IBD26/00 erzeugte in VH2-Zellkulturen Synzytien und die Bildung von intrazytoplasmatischen Einschlüssen. Die Einschlüsse sind eosinophil (H&E-Färbung) bzw. azidophil (Giemsa-Färbung).

Bei der transmissionselektronischen Untersuchung der Einschlüsse konnten eine lockere Innenstruktur und Viruspartikel in der Peripherie des Einschlusses gefunden werden.

7. Mittels der PAGE konnten auch bei den Reisolaten die typischen 10 Gensegmente der Orthoreoviren dargestellt werden. Das beobachtete Wanderungsmuster der einzelnen Gensegmente zeigt, dass sich das Virus IBD26/00 von anderen bisher publizierten Reptilien- Orthoreoviren in dieser Hinsicht unterscheidet.

8. Gegen das Isolat IBD26/00 hergestellte Antikörper markieren infizierte Zellen in der Zellkultur und bindet an deren intrazytoplasmatische Einschlüsse. In den infizierten Tieren konnte das Virus immunhistologisch nicht dargestellt werden.

9. Mittels der immunhistologischen Untersuchung auf Aktin, Desmin, Vimentin, Neurofilament und Zytokeratin konnte gezeigt werden, dass die in der Zellkultur gebildeten Einschlüsse Desmin-, Vimentin-, Neurofilament- und Zytokeratin-negativ sind, während sie sich Aktin-positiv darstellen. Die im Tier S1979/00, aus welchem das Ursprungsisolat stammt, beobachteten intrazytoplasmatischen Einschlüsse stellen sich ebenfalls Desmin-, Vimentin-, Neurofilament- und Zytokeratin-negativ dar. Das Intermediärfilament Aktin konnte bei diesen Einschlüssen jedoch immunhistologisch nicht nachgewiesen werden.

5.1 Summary

1. The purpose of this study was to evaluate the pathogenicity of the Orthoreovirus IBD26/00, isolated from a *Boa constrictor* suffering from inclusion body disease, by experimental infection.
2. The first part of the literature review deals with the present knowledge on the family *Reoviridae*, especially Orthoreoviruses. The second part provides an overview on the diseases caused by Orthoreoviruses and their pathogenesis.
3. 10 juvenile *Boa constrictors* were infected with the Orthoreovirus IBD26/00, 5 animals served as controls. Over a period of 49 weeks, the animals were euthanized and virologically, histologically, bacteriologically and parasitologically examined.
4. Until 18 weeks *post infectionem*, the Virus was reisolated from different organs of all infected snakes. Virus was also reisolated from one control snake. During the first weeks *post infectionem*, the control snakes gained weight faster compared to the infected animals.
5. In three of four virologically positive snakes a mixed inflammatory cell infiltration in the liver was observed histologically. These findings were interpreted as reparation of lesions due to infection with Orthoreovirus IBD26/00.
6. The isolate IBD26/00 induced syncytial formation and production of intracytoplasmatic inclusion bodies in viper heart cells (VH2). The inclusions are eosinophile (H&E-stain) respectively acidophilic (Giemsa-stain). Transmission electron microscopical examinations showed a loose structure of the inclusions and reovirus particles at the periphery of these inclusions.
7. Using PAGE, the typical 10 segments of an orthoreovirus genome were demonstrated for the original virus IBD26/00 as well as for all reisolates. The migration pattern of the RNA segments in PAGE indicates that the orthoreovirus IBD26/00 differs from other reoviruses from reptiles used for comparison.

8. An antibody against the original Isolate IBD26/00 was produced and marked infected VH2 cells and the intracytoplasmatic inclusion bodies in these cells. Immunohistologically, however, no positive reaction could be seen in organs and tissues of infected animals.

9. By immunohistology it could be shown that the intracytoplasmatic inclusion bodies in infected VH2 cell cultures are cytokeratin-, desmin-, vimentin- and neurofilament-negative, but actin-positive.

Intracytoplasmatic inclusion bodies found in the organs of the snake S1979/00, from which the original virus isolate was obtained, were also cytokeratin-, desmin-, vimentin-, and neurofilament-negative. These inclusions were, however, actin negative in contrast to the inclusions in the infected cell cultures.

6. Lösungen, Puffer und Bezugsquellen

6.1 Lösungen für die Zellkultur

6.1.1 Dulbecco Phosphat-Puffer (DPB)

Dankenswerter Weise wurde in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen das für den Transport lebender Leber- und Nierenzellen benötigte DPB nach folgendem Rezept hergestellt.

1. 80 g NaCl (Merck, Darmstadt)
2. 2 g KCl (Merck, Darmstadt)
3. 11,5 g Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt)
4. 2g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt)
5. mischen und in 1 l Aqua bidest. in Lösung bringen
6. in Glasflaschen portionieren und mit Alufolie abdecken
7. autoklavieren und anschließend Glasflaschen mit Gummistopfen fest verschließen
8. bis zum Gebrauch bei Zimmertemperatur lagern (max. 12 Monate)
9. zur Herstellung der Gebrauchslösung Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen

6.1.2 Basal Medium mit Earls Salzen (BME)

1. 200 ml BME (Seromed, Biochrom, Berlin)
2. 200 ml Tryptose Phosphat Bouillon (Difco, Michigan, USA)
3. 30 ml Hepes-Puffer (Paa Laboratories, Pasching, Österreich)
4. 20 ml L-Glutamin (Seromed, Biochrom, Berlin)
5. 1 ml Nystatin (Hermal, Heidelberg)
6. 2 ml Gentamycin (Seromed, Biochrom, Berlin)
7. 3,6 ml NaOH (Merck, Darmstadt)
8. 1543,4 ml Aqua dest.
9. steril abfüllen und bis zur weiteren Verwendung bei 6 °C lagern
10. kurz vor Gebrauch 0,08 % Amphotericin (Sigma, Missouri, USA) dazu geben
11. 10 % FKS dazu geben
12. bis zum endgültigen Gebrauch bei 6 °C lagern (max. 2 Wochen)

6.1.3 Trypsinlösung

Dankenswerter Weise wurde in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität Gießen das für die Primärzellkultur-Herstellung verwendete Trypsin nach folgendem Rezept hergestellt.

1. 4 g Trypsinpulver (Difco, Michigan, USA)
2. 10 g Glukose-Monohydrat (Merck, Darmstadt)
3. in 1 l DPB-Stammlösung (6.1.1) unter Schütteln im Wasserbad bei 37 °C lösen
4. in sterile Flaschen portionieren und mit Alufolie abdecken
5. autoklavieren und Glasflaschen anschließend mit Gummistopfen fest verschließen
6. bei –20 °C aufbewahren (max. 6 Monate)
7. zur Herstellung der Gebrauchslösung Stammlösung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen

6.2 Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

6.2.1 Beladungs-Lösung

1. in Aqua bidest. soviel Saccharose (Roth, Karlsruhe) lösen, bis eine gesättigte Lösung entsteht
2. ca. 5 % Bromphenolblau (Merck, Darmstadt) in die Lösung geben
3. bei 6 °C bis zum Gebrauch lagern

6.2.2 Elektrodenpuffer

1. 1,52 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, Darmstadt)
2. 7,20 g Glycin (Roth, Karlsruhe)
3. 0,50 g SDS ultra pure (Roth, Karlsruhe)
4. zusammenfügen und mit Aqua bidest. auf 500 ml auffüllen
5. den pH mit 1 molare HCl (Titrisol®; Merck, Darmstadt) auf 8,3 einstellen

6.2.3 Trennpuffer

1. 181,71g Tris(hydroxymethyl)aminomethan in 1 l Aqua dest. lösen und mit 1 molarer HCl (Titrisol®; Merck, Darmstadt) auf pH 8,8 eingestellt

6.3 Lösungen für die histologische und elektronenmikroskopische Untersuchung

6.3.1 Cacodylatpuffer-Lösung

1. 21,4 g (1 Mol) Cacodylsäure (Roth, Karlsruhe) in 1 l Aqua bidest. lösen
2. bis zum Gebrauch dunkel und kühl lagern

6.3.2 Cacodylatgepuffertes Formalin

1. 10 % Formaldehyd, 37 % (Roth, Karlsruhe)
2. 37,5 % 1 molare Cacodylatpuffer-Lösung (6.3.1)
3. 52,5 % Aqua bidest.
4. gut mischen
5. pH mit 1 molarer HCl (Titrisol®; Merck, Darmstadt) auf 7,3 einstellen und bei 6 °C lagern

6.3.3 Cacodylatgepuffertes Glutaraldehyd

1. aus der 1 molaren Cacodylatpuffer-Lösung (6.3.1) mit Aqua dest. einen 375 mM Cacodylatpuffer herstellen. Davon 80 ml nehmen.
2. 20 ml Glutaraldehyd zugeben und beide Bestandteile gut mischen

6.4 Lösungen für die immunhistologische Untersuchung

6.4.1 Imidazol/HCl-Puffer 0,1 molar (pH 7,1)

1. 6,81 g Imidazol (Fluka, Neu Ulm) in 1 l Aqua dest. lösen
2. Imidazol-Lösung mit ca. 500 ml 0,1 molarer HCl (Titrisol®, Merck, Darmstadt) auf pH 7,1 einstellen

6.4.2 Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

1. 42 g NaCl (Merck, Darmstadt)
2. 9,26 g di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
3. 2,15 g Kaliumphosphat (Merck, Darmstadt)
4. in 1 l Aqua bidest. lösen
5. zur Herstellung der Gebrauchslösung, Stammlösung 1:5 mit Aqua bidest. verdünnen und pH Wert mit 1 N HCl (Merck, Darmstadt) auf 7,2 einstellen

6.4.3 Trisgepufferte Salzlösung (TBS)

1. 60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck, Darmstadt)
2. in 610 ml Aqua bidest. lösen
3. mit ca. 390 ml 1 N HCl (Merck, Darmstadt) auf pH 7,6 einstellen
4. zur Herstellung der Gebrauchslösung, Stammlösung 1:10 mit 0,8 % NaCl-Lösung gut mischen

6.4.4 Zitratpuffer (pH 6,0)

1. Stammlösung A: 21,01 g Zitronensäure in 1 l Aqua dest. lösen
2. Stammlösung B: 29,41 g Natriumzitrat in 1 l Aqua dest. lösen
3. zur Herstellung der Gebrauchslösung 9 ml Stammlösung A mit 41 ml Stammlösung B in 450 ml Aqua dest. mischen
4. pH Wert auf 2 N NaOH (Merck, Darmstadt) auf 6,0 einstellen

7. Literaturverzeichnis

- Ahne, W., Thomsen, I., Winton, 1987. Isolation of a reovirus from the snake, *Python regius*. *Arch. Virol.* 94 (1-2), 135-139.
- Ammermann, P., 1999. Klinische Untersuchung wildlebender Großleguane (*Ctenosaura bakeri*, *Ctenosaura similis* und *Iguana iguana*) auf den Inseln Utila und Roatan (Honduras, Mittelamerika) mit virologischen, bakteriologischen, mykologischen und parasitologischen Beiträgen sowie Angaben ausgewählter Blutparameter. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.
- Anderson, N., Doane, F.W., 1966. An electron-microscope study of reovirus type 2 in L-cells. *J. path. bact.* 92(2), 433-439.
- Barton, E.S., Chappell, J.D., Connolly, J.L., Forrest, J.C., Dermody, T.S., 2001. Reovirus receptors and apoptosis. *Virology* 290 (2), 173-180.
- Becker, M.M., Goral, M., Hazelton, P.R., Baer, B.S., Rodgers, S.E., Brown, E.G., Coombs, K.M., Terence, S., 2001. Reovirus sigmaNS protein is required for nucleation of viral assembly complexes and formation of viral inclusions. *J. Virol.* 75(3), 1459-1475.
- Binder, S., 2002. *Boa constrictor*; NTV-Verlag, Münster, pp 96.
- Blahak, S., Ott, I., Vieler, E., 1995. Comparison of 6 different reoviruses of various reptiles. *Vet. Res.* 26(5-6), 470-476.
- Brentano, L., Noah, D.L., Brown, E.G., Sherry, B., 1998. The reovirus protein mu2, encoded by the M1 gene, is an RNA-binding protein. *J. Virol.* 72(10), 8354-8357.
- Broering, T.J., Parker, J. S., Joyce, P.L., Kim, J., Nibert, M.L., 2002. Mammalian reovirus nonstructural protein microNS forms large inclusions and colocalizes with reovirus microtubule-associated protein mu2 in transfected cells. *J. Virol.* 76(16), 8285-8297.
- Brown, E.G., Nibert, M.L., Fields, B.N., 1983. The L2 Gene of reovirus serotyp 3 controls the capacity to interfere, accumulate deletions and establish persistent infection. In: Compans R.W., Bishop D.H.L. (Eds.) *Proceedings of the 1st International Symposium on Double-Stranded RNA Viruses*. 1982 Feb; Saint Thomas, US Virgin Islands. New York: Elsevier Press; pp. 275-287.

- Bujnicki, J.M., Rychlewski, L., 2001. Reassignment of specificities of two cap methyltransferase domains in the reovirus lambda 2 protein. *Genome Biol.* 2(9), research0038.1–research0038.6.
- Cambre, R.C., Green, D.E., Smith, E.E., Montali, R.J., Bush, M., 1980. Salmonellosis and arizonosis in the reptile collection at the National Zoological Park. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177(9), 800-803
- Chappell, J.D., Duncan, R., Mertens, P.P.C., Dermody, T.S. 2005. Reoviridae. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A., (Eds.) *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses. 8th Report of the ICTV.* Elsevier Academic Press, London, pp 447-465.
- Carlisle-Nowak, M., Sullivan, N., Carrigan, M., Knight, C., Jacobson, E., 1998. Inclusion body disease in two captive Australian python (*Morelia spilota variegata* and *Morelia spilota spilota*). *Aust. Vet. J.* 76(2), 98-100.
- Coffey, M.C., Strong, J.E., Forsyth, P.A., Lee, P.W., 1998. Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* 282(5392), 1332-1334.
- Connolly, J.L., Rodgers, S.E., Clarke, P., Ballard, D.W., Kerr, L.D., Tyler, K.L., Dermody, T.S., 2000. Reovirus-induced apoptosis requires activation of transcription factor NF-kappaB. *J. Virol.* 74(7), 2981-2989.
- Connolly, J.L., Barton, E.S., Dermody, T.S., 2001. Reovirus binding to cell surface sialic acid potentiates virus-induced apoptosis. *J. Virol.* 75(9), 4029-4039.
- Coombs, K.M., Fields, B.N., Harrison, S.C., 1990. Crystallization of the reovirus type 3 Dearing core. Crystal packing is determined by the lambda 2 protein. *J. Mol. Biol.* 215(1), 1-5.
- Corcoran, J.A., Duncan, R., 2004. Reptilian reovirus utilizes a small type III protein with an external myristylated amino terminus to mediate cell-cell fusion. *J. Virol.* 78(8), 4342-4351.
- Danis, C., Mabrouk, T., Garzon, S., Lemay, G., 1993. Establishment of persistent reovirus infection in SC1 cells: absence of protein synthesis inhibition and increased level of double-stranded RNA-activated protein kinase. *Virus Res.* 27(3), 253-265.
- Dermody, T.S., Nibert, M.L., Wetzell, J.D., Tong, X., Fields, B.N., 1993. Cells and viruses with mutations affecting viral entry are selected during persistent infections of L cells with mammalian reoviruses. *J. Virol.* 67(4), 2055-2063.

- Drewnoski, G., 1996. Königsboas (Boa Constrictor) im Terrarium; Bede-Verlag, pp. 64.
- Drury, S. E., Gough, R.E., Welchman, D., 2002. Isolation and identification of a reovirus from a lizard, *Uromastyx hardwickii*, in the United Kingdom. *Vet. Rec.* 151(21), 637-638.
- Dryden, K.A., Wang, G., Yeager, M., Nibert, M.L., Coombs, K.M., Furlong, D.B., Fields, B.N., Baker, T.S., 1993. Early steps in reovirus infection are associated with dramatic changes in supramolecular structure and protein conformation: analysis of virions and subviral particles by cryoelectron microscopy and image reconstruction. *J. Cell Biol.* 122(5), 1023-1041.
- Duncan, R., Chen, Z., Walsh, S., Wu, S., 1996. Avian reovirus-induced syncytium formation is independent of infectious progeny virus production and enhances the rate, but is not essential, for virus-induced cytopathology and virus egress. *Virology* 224(2), 453-464.
- Duncan, R., Corcoran, J., Shou, J., Stoltz, D., 2004. Reptilian Reovirus: a new fusogenetic orthoreovirus species. *Virology* 319(1), 131-140.
- Etoh, T., Himeno, Y., Matsumoto, T., Aramaki, M., Kawano, K., Nishizono, A., Kitano, S., 2003. Oncolytic viral therapy for human pancreatic cancer cells by reovirus. *Clin. Cancer Res.* 9(3), 1218-1223.
- Ferguson, H.W., Millar, S.D., Kibenge, F.S.B., 2003. Reovirus-like hepatitis in farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Vet. Rec.* 153(3), 86-87.
- Frye, F.L., 1991. Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry. 2nd Ed. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, USA.
- Giordano, M.O., Martinez, L.C., Isa, M.B., Ferreyra, L.J., Canna, F., Pavan, J.V., Paez, M., Notario, R., Nates, S.V., 2002. Twenty year study of the occurrence of reovirus infection in hospitalized children with acute gastroenteritis in Argentina. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 21(9), 880-882.
- Gomatos, P.J., Tamm, I., Dales, S., Franklin, R.M., 1962. Reovirus Type 3: Physical characteristics and interaction with L cells. *Virology* 17, 441-454.
- Goodwin, M.A., Davis, J.F., Player, E.C., 1993. Reovirus-associated enteritis in Georgia broiler chicks. *Avian Dis.* 37(1), 229-233.
- Gräber, M., 1994. Zum Vorkommen von Reoviren bei wildlebenden Graupapageien in Westafrika. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.

- Gravendyck, M., Ammermann, P., Marschang, R.E., Kaleta, E.F., 1998. Paramyxoviral and reoviral infections of iguanas on Honduran Islands. *J. Wildl. Dis.* 34(1), 33-38.
- Guy, J.S., Levy, M.G., Lye, D.H., Barnes, H.J., Gerig, T.M., 1988. Interaction of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 32(3), 381-390.
- Hauser, B., Mettler, F., Rubel, A., 1983. Herpesvirus-like infection in two young boas. *J. Comp. Pathol.* 93(4), 515-519.
- Hieronimus, D.R., Villegas, P., Kleven, S.H., 1983. Identification and serological differentiation of several reovirus strains isolated from chickens with suspected malabsorption syndrome. *Avian Dis.* 27(1), 246-254.
- Hierholzer, J.C., Killington, R.A., 1996. Virus isolation and quantitation. In: Mahy, B. W. J. und Kangro, H. O., (Eds.) *Virology Methods Manual*. Academic Press, Harcourt Brace and Company, London, pp 25-46.
- Huder, J.B., Boni, J., Hatt, J.M., Soldati, G., Lutz, H., Schupbach, J., 2002. Identification and characterization of two closely related unclassifiable endogenous retroviruses in pythons (*Python molurus* and *Python curtus*). *J. Virol.* 76(15), 7607-7615.
- Huther, S., 1996. Identifizierung und Charakterisierung von Reoviren aus verschiedenen Ziervogelarten. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.
- Islam, M.R., Jones, R.C., Kelly, D.F., 1988. Pathogenesis of experimental reovirus tenosynovitis in chickens: Influence of the route of infection. *J. Comp. Pathol.* 98(3), 325-336.
- Jacobson, E., Oros, J., Tucker, S., Pollock, D., Kelley, K., Munn, R., Lock, B., Mergia, A., Yamamoto, J., 2001. Partial characterization of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease. *Am. J. Vet. Res.* 62(2), 217-224.
- Jacobson, E.R., Adams, H.P., Geisbert, T.W., Tucker, S.J., Hall, B.J., Homer, B.L., 1997. Pulmonary lesions in experimental ophidian paramyxovirus pneumonia of Aruba Island rattlesnakes, *Crotalus unicolor*. *Vet. Pathol.* 34(5), 450-459.
- Jarofke, D., Lange, L., 1993. Reptilien: Krankheiten und Haltung. Paul Parey Verlag. Hamburg und Berlin. pp 188.

- Johnsrude, J.D., Raskin, R.E., Hoge, A.Y., Erdos, G.W., 1997. Intraerythrocytic inclusions associated with iridoviral infection in a fer de lance (*Bothrops moojeni*) snake. *Vet. Pathol.* 34(3), 235-238.
- Joklik, W.K., 1981. Structure and function of the reovirus genome. *Microbiol. Rev.* 45(4), 483-501.
- Kauffman, R.S., Wolf, J.L., Finberg, R., Trier, J.S., Fields, B.N., 1983. The sigma 1 protein determines the extent of spread of reovirus from the gastrointestinal tract of mice. *Virology* 124(2), 403-410.
- Kojimoto, A., Uchida, K., Horii, Y., Okumura, S., Yamaguchi, R., Tateyama, S., 2001. Amebiasis in Four Ball Pythons, *Python regius*. *J. Vet. Med. Sci.* 63(12), 1365-1368.
- Labrada, L., Bodelon, G., Vinuela, J., Benavente, J., 2002. Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. *J. Virol.* 76(16), 7932-7941.
- Lamirande, E.W., Nichols, D.K., Owens J.W., Jacobson, E.R., 1999. Isolation and experimental transmission of a reovirus pathogenic in ratsnakes (*Elaphe* species). *Virus Res.* 63(1-2), 135-141.
- Leland, M.M., Hubbard, G.B., Sentmore, H.T., Soike, K.F., Hilliard, J.K., 2000. Outbreak of orthoreovirus-induced meningoencephalomyelitis in baboons. *Comp. Med.* 50(2), 199-205.
- Magee, D.L., Montgomery, R.D., Maslin, W.R., Wu, C.C., Jack, S.W., 1993. Reovirus associated with excessive mortality in young bobwhite quail. *Avian Dis.* 37(4), 1130-1135.
- Mandelli, G., Rampin, T., Finazzi, M., 1978. Experimental reovirus hepatitis in newborn chicks. *Vet. Pathol.* 15(4), 531-543.
- Mann, M.A., Knipe, D.M., Fischbach, G.D., Fields, B.N., 2002. Type 3 reovirus neuroinvasion after intramuscular inoculation: direct invasion of nerve terminals and age-dependent pathogenesis. *Virology* 303(2), 222-231.
- Marschang, R.E., 2000. Isolierung und Charakterisierung von Irido-, Herpes- und Reoviren aus Landschildkröten sowie Beschreibung eines nicht charakterisierten zytopathogenen Agens. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.

- Marschang, R.E., Donahoe, S., Manvell, R., Lemos-Espinal, J., 2002. Paramyxovirus and reovirus infections in wild-caught Mexican lizards (*Xenosaurus* and *Abronia* spp.). *J. Zoo. Wildl. Med.* 33(4), 317-321.
- Mbisa, J.L., Becker, M.M., Zou, S., Dermody, T.S., Brown, E.G., 2000. Reovirus mu2 protein determines strain-specific differences in the rate of viral inclusion formation in L929 cells. *Virology* 272(1), 16-26.
- Mitchell, M.A., Shane, S.M., 2000. Preliminary findings of *Salmonella* spp. in captive green iguanas (*Iguana iguana*) and their environment. *Prev. Vet. Med.* 45(3-4), 297-304.
- Montgomery, L.B., Kao, C.Y., Verdin, E., Cahill, C., Maratos-Flier, E., 1991. Infection of a polarized epithelial cell line with wild-type reovirus leads to virus persistence and altered cellular function. *J. Gen. Virol.* 72(12): 2939-2946.
- Morin, M.J., Warner, A., Fields, B. N., 1996. Reovirus infection in rat lungs as a model to study the pathogenesis of viral pneumonia. *J. Virol.* 70(1), 541-548.
- Morrison, L.A., Fields, B.N., Dermody, T.S., 1993. Prolonged replication in the mouse central nervous system of reoviruses isolated from persistently infected cell cultures. *J. Virol.* 67(6), 3019-3026.
- Ni, Y., Ramig, R.F., 1993. Characterization of avian reovirus-induced cell fusion: the role of viral structural proteins. *Virology* 194(2), 705-714.
- Nibert, M. L., Schiff, L.A., 2001. Reoviruses and their replication. In: *Fields Virology* 2, 4th Ed., p. 1679-1728. D. Knipe and P. Howley (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Onderka, D.K., Finlayson, M.C., 1985. *Salmonellae* and salmonellosis in captive reptiles. *Can. J. Comp. Med.* 49(3), 268-270.
- Orós, J., Trucker, S., Jacobson, E., 1998. Inclusion body disease in two captive boas in Canary Islands. *Vet. Rec.* 143(10), 283-285.
- Ott, I., 1998. Identifizierung und Charakterisierung von Reoviren aus verschiedenen Schlangen und Leguanen. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.
- Ramis, A., Fernandez-Bellon, H., Majo, N., Martinez-Silvestre, A., Latimer, K., Campagnoli, R., 2000. Adenovirus hepatitis in boa constrictor (*Boa constrictor*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 12(6), 573-576.

- Rhim, J.S., Jordan, L.E., Mayor, H.D., 1962. Cytochemical, fluorescent-antibody and electron microscopic studies on the growth of reovirus (ECHO 10) in tissue culture. *Virology* 17, 342-355.
- Richardson, S.C., Bishop, R.F., Smith, A.L., 1994. Reovirus serotype 3 infection in infants with extrahepatic biliary atresia or neonatal hepatitis. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 9(3), 264-268.
- Ruff, M. D., Rosenberger, J. K., 1985. Concurrent infections with reoviruses and coccidia in broilers. *Avian Dis.* 29(2), 465-478.
- Raymond, J.T., Garner, M.M., Nordhaus, R.W., Jacobson, E.R., 2001. A disease resembling inclusion body disease of boid snakes in captive palm vipers (*Bothriechis marchi*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 13(1), 82-86.
- Sharpe, A.H., Chen, L.B., Fields, B.N., 1982. The interaction of mammalian reoviruses with the cytoskeleton of monkey kidney CV-1 cells. *Virology* 120(2), 399-411.
- Songserm, T., Pol, J.M., van Roozelaar, D., Kok, G.L., Wagenaar, F., ter Huurne, A.A., 2000. A comparative study of the pathogenesis of malabsorption syndrome in broilers. *Avian Dis.* 44(3), 556-567.
- Schramme, K.C., 2003. Nachweis von Salmonellen spp. bei Landschildkröten. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.
- Schumacher, J., 1992. Ätiologische und pathologische Untersuchungen über die sog. Einschlusskörperchenkrankung der Riesenschlangen (Boidae). Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Schumacher, J., Jacobson, E., Homer, B., Gaskin, J., 1994. Inclusion body disease in boid snakes. *J. Zoo Wildl. Med.* 25(4), 511-524.
- Shmulevitz, M., Duncan, R., 2000. A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses. *EMBO J.* 19(5), 902-912.
- Sievers-Kruse, G. A., 1992. Untersuchungen an zwei Reovirusstämmen aus Flugenten (*Cairina moschata*) sowie zur Epizootiologie der Viren bei Flugenten in der Bundesrepublik Deutschland. Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.
- Strong, J.E., Tang, D., Lee, P.W., 1993. Evidence that the epidermal growth factor receptor on host cells confers reovirus infection efficiency. *Virology* 197(1), 405-411.

- Sturzenbecker, L.J., Nibert, M., Frulong, D., Fields, B.N., 1987. Intracellular digestion of reovirus particles requires a low pH and is an essential step in the viral infectious cycle. *J. Virol.* 61(8), 2351-2361.
- Takehara, K., Kawai, C., Seki, A., Hashimoto, N., Yoshimura, M., 1989. Identification and characterization of an avian reovirus isolated from black-tailed gull (*Larus crassirostris*). *Kitasato Arch. Exp. Med.* 62(4), 187-198.
- Tang, K. N., Fletcher, O.J., 1987. Application of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) technique for detecting avian reovirus in chickens. *Avian Dis.* 31, 591-596.
- Tang, K.N., Fletcher, O.J., Villegas, P., 1987a. Comparative study of the pathogenicity of avian reoviruses. *Avian Dis.* 31(3), 577-583.
- Tang, K.N., Fletcher, O.J., Villegas, P., 1987b. The effect on newborn chicks of oral inoculation of reovirus isolated from chickens with tenosynovitis. *Avian Dis.* 31(3), 584-590.
- Tyler, K. L., 2001. Mammalian reoviruses In: *Fields Virology 2*, 4th Edit., p. 1729-1745. D. Knipe and P. Howley (Eds.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.
- Tyler, K. L.; Oldstone, M. B. A., 1998. Reovirus I. In: *Current topics Microbiology and Immunology* 233, I., Tyler, K.L, Oldstone, M.B.A. (Eds.). Springer-Verlag. New York, pp.260.
- Tyler, K. L.; Oldstone, M. B. A., 1998. Reovirus II. In: *Current topics Microbiology and Immunology* 233, I., Tyler, K.L, Oldstone, M.B.A. (Eds.). Springer-Verlag, New York, pp.220.
- Tyler, K.L., Squier, M.K., Brown, A.L., Pike, B., Willis, D., Oberhaus, S.M., Dermody, T.S., Cohen, J.J., 1996. Linkage between reovirus-induced apoptosis and inhibition of cellular DNA synthesis: role of the S1 and M2 genes. *J. Virol.* 70, 7984-7991.
- Vieler, E., Baumgärtner, W., Herbst, W., Kohler, G., 1994. Characterization of a reovirus isolate from a rattle snake, *Crotalus viridis*, with neurological dysfunction. *Arch. Virol.* 138(3-4), 341-344.
- Wages, D.P., Ficken, M.D., 1989. Cryptosporidiosis and turkey viral hepatitis in turkeys. *Avian Dis.* 33(1), 191-194.
- West, G., Garner, M., Raymond, J., Latimer, K.S, Nordhausen R., 2001. Meningoencephalitis in a Boelen's python (*Morelia boeleni*) associated with paramyxovirus infection. *J. Zoo Wildl. Med.* 32(3), 360-365.

- Wiener, J.R., Joklik, W.K., 1988. Evolution of reovirus genes: a comparison of serotype 1, 2, and 3 M2 genome segments, which encode the major structural capsid protein mu 1C. *Virology* 163(2), 603-613.
- Wilcox, G.E., Compans, R.W., 1982. Cell fusion induced by Nelson Bay virus. *Virology* 123(2), 312-322.
- Wozniak, E., McBride, J., DeNardo, D., Tarara, R., Wong, V., Osburn, B., 2000. Isolation and characterization of an antigenically distinct 68-kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in Boa constrictors chronically infected with the inclusion body disease virus (IBDV: Retroviridae). *Vet. Pathol.* 37, 449-459.
- Zou, S., Brown, E., 1996. Stable expression of the reovirus mu2 protein in mouse L cells complements the growth of a reovirus ts mutant with a defect in its M1 gene. *Virology* 217(1), 42-48.
- Zou, S., Brown, E.G., 1992. Nucleotide sequence comparison of the M1 genome segment of reovirus type 1 Lang and type 3 Dearing. *Virus Res.* 22(2), 159-164.

8. Anhang

8.1 Gewichtsentwicklung der Tiere

Tab. 13: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere

	09.01.02	17.02.02	12.04.02	14.05.02	28.05.02	09.07.02	19.08.02	24.09.02	09.11.02	25.03.03
K11	192	230	250	300	356					
I1	280	312	390	480	532					
I17	164	192	226	304	368					
K8	204	248	320	460	488	564				
I3	204	238	282	370	446	560				
I14	102	148	181	278	348	400				
K2	100	206	256	340	440	596	704			
I4	280	290	332	450	512	530	600			
I16	194	220	309	390	442	570	598			
K15	172	244	294	430	450	n.u.	706	878	1056	
I12	226	246	302	430	542	530	668	737	834	
I13	182	180	212	300	326	480	542	677	834	
K10	150	188	292	430	n.u.	560	682	826	1050	1363
I7	210	198	268	350	370	520	558	608	676	1371
I9	212	250	327	306	356	460	558	674	889	1356

K: Tier der Kontrollgruppe mit individueller Nummer; I: Tier aus der Gruppe der infizierten Tiere mit individueller Nummer; n.u.: nicht untersucht.

Grau hinterlegt ist der Tag an dem die Tiere infiziert bzw. scheininfiziert wurden.

8.2 Tierdaten zum Zeitpunkt der Sektion

Tab. 14: Tierdaten zum Zeitpunkt der Sektion

	TIER	GEWICHT IN GRAMM	LÄNGE IN CM	GESCHLECHT
28.05.02 6 Wochen p.i.	K11	365	86	männlich
	I1	532	102	männlich
	I17	368	89	männlich
10.07.02 12 Wochen p.i.	K8	564	116	weiblich
	I3	560	102	weiblich
	I14	400	82	männlich
27.08.02 18 Wochen p.i.	K2	704	112	männlich
	I4	600	106	männlich
	I16	598	111	weiblich
11.11.02 30 Wochen p.i.	K15	1056	121	weiblich
	I12	894	117	männlich
	I13	834	117	weiblich
25.03.03 49 Wochen p.i.	K10	1353	130	männlich
	I7	1371	133	weiblich
	I9	1356	135	männlich

8.3 Ergebnis der histologischen Untersuchung

8.3.1 Magen-Darm-Trakt

Tab. 15: Histologische Ergebnisse: Magen-Darm-Trakt

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Ösophagus	+/++ Ly/ P + H/ B	o.b.B	o.b.B	GALT aktiv o.b.B	+ Ly/ P/ H/ B	+/++ Ly/ P/ B -/+ H	GALT aktiv o.b.B	o.b.B	+/++ Ly/ P/ H/ B
Magenepithel	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	-/+ Ly
kranialer Dünndarm	+++ Ly/ P + H in Submukosa	ggr. Epithel- hyperplasie + L/ P	+ Ly/ P	+++ Ly/ P +/++ H +/++ Apop.	+/-++ Ly/ P +/++ Apop.	+++ Ly/ P ++/+++ H +/- Apop.	+++ Ly/ P -/+ Apop.	+++ Ly/ P + H ++ Apop.	+ Ly/ P -/+ Apop.
kaudaler Dünndarm	+++ Ly/ P + H	Epithel- hyperplasie	-/+ H ++ Apop.	++/+++ Ly/ P ++ H + Apop.	+ H +/- Apop.	++ Ly/ P + H ++/+++ Apop.	++/+++ Ly/ P -/+ Apop.	++/+++ Ly/ P +/++ H +++ Apop.	+++ Ly/ P/ H -/+ Apop.
Kolon	+/++ Ly/P + H	o.b.B	++ Ly/ P/ H	o.b.B	++/+++ H	+ H -/+ B	+ H	o.b.B	o.b.B

Tab. 15 (Fortsetzung):

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Zäkum	+ /++ Ly/ P +++ H	+ Ly/ P	+ /++ Ly/ P mgr. Ödem	o.b.B	o.b.B	o.b.B	+ Ly /P + H -/+ Apop.	+ H	+ /++ H

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Ösophagus	o.b.B	o.b.B	o.b.B	+ /++ Ly/ P ++ B	+ Ly/ P/ B -/+ H	o.b.B
Magenepithel	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	
kranialer Dünndarm	++ Ly/ P	++ /+++ Ly/ P	+ /++ Ly/ P	+ Ly/ P -/+ Apop. Vakulolen PAS neg.	++ Ly/ P.	+ /++ Ly/ P
kaudaler Dünndarm	+ Ly + Apop.	o.b.B	++ Ly	ggr. Vakuolen	o.b.B	Fokal H -/+ B + Ly/ P -/+ Apop.
Kolon	+ Ly/ P +++ H	o.b.B	+ /++ H	o.b.B	++ H	+ /++ Ly/ P/ H + B

Tab. 15 (Fortsetzung):

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Zäkum	++ Ly/ P +++ H kleine Abszesse an Serosa	+ / ++ H	o.b.B	+++ H	++ H	+ / ++ H

Erläuterung der Abkürzungen: o.b.B: ohne besonderen Befund; B: basophile Granulozyten; ggr.: geringgradig; H: heterophile Granulozyten; Ly: Lymphozyten; mgr.: mittelgradig; P: Plasmazellen

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet		Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet		Skalierung für Apoptosen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet.	
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs		+: 2- 5 Zellen		+/-: 1 Apoptose	
+ / ++: 46- 60		+ / ++: 6- 10		+: 2- 3	
++: 61- 75		++: 11- 15		+ / ++: 4- 5	
++ / +++: 76- 90		++ / +++: 16- 20		++: 6- 7	
+++ : ≥ 91		+++ : ≥ 21		++ / +++: 8- 9	
				+++ : ≥ 10	

8.3.2 Pankreas

Tab. 16: Histologische Ergebnisse: Pankreas

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Endokriner Pankreas	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B		+/- H	+ Ly/ P/ H	++/+++ Ly/ H
Exokriner Pankreas	o.b.B	o.b.B	ggr. multifokale gemischt-zellige Infiltration	+ Ly	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	++ Ly mgr. multifokale gemischt-zellige Infiltration
Ausführungsgänge	+ / ++ Ly/ P/ H	o.b.B	o.b.B	ggr. Ödem	o.b.B	ggr. Ödem	o.b.B	++ Ly/ P	o.b.B

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Endokriner Pankreas	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Exokriner Pankreas	o.b.B	- / + Ly/ P	o.b.B	o.b.B	+ Ly/ H	multifokale H.-Infiltration mit Zelluntergängen
Ausführungsgänge	o.b.B	ggr. Ödem	o.b.B	ggr. Ödem	o.b.B	ggr. Ödem

Erläuterung der Abkürzungen: o.b.B: ohne besonderen Befund; ggr.: geringgradig; H: heterophile Granulozyten; Ly: Lymphozyten; mgr.: mittelgradig; P: Plasmazellen.

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs	+: 2- 5 heterophile Granulozyten
+ / ++: 46- 60	+ / ++: 6- 10
++: 61- 75	++: 11- 15
++ / +++: 76- 90	++ / +++: 16- 20
+++ : ≥ 91	+++ : ≥ 21

Tab. 17: Histologische Ergebnisse: Leber

Tab. 17: Histologische Ergebnisse: Leber

[illegible]

Tab. 17 (Fortsetzung):

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Hepatozyten	ggr. Vakuolen	ggr. Vakuolen	mgr. Vakuolen	ggr./ mgr. Vakuolen	ggr./ mgr. Vakuolen	mgr. Vakuolen
Sinusoide	-/+ Ly/ P ++ H	+ Ly/ P/ H	+ Ly/ P/ H/ B	+ Ly/ P/ H	+ Ly/ P/ H/ B	+ Ly/ P
Sternzellen	nich prominent	nicht prominent	nicht prominent	nicht prominent	teilw. prominent	teilw. prominent
Blutgefäße	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Gallengänge	+ H	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	++ H viel Bdgw.
Gallenblase	+ Ly	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B

Erläuterung der Abkürzungen: o.b.B: ohne besonderen Befund; B: basophile Granulozyten; hgr.: hochgradig; Bdgw.: Bindegewebe; ggr.: geringgradig; H: heterophile Granulozyten; Ly: Lymphozyten; mgr.: mittelgradig; P: Plasmazellen; teilw.: teilweise.

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet		Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs		+: 2- 5 heterophile Granulozyten	
+ / ++: 46- 60		+ / ++: 6- 10	
++: 61- 75		++: 11- 15	
++ / +++: 76- 90		++ / +++: 16- 20	
+++ : ≥ 91		+++ : ≥ 21	

8.3.4 Milz

Tab. 18: Histologische Ergebnisse: Milz

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Lymphozyten	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	im Rand- bereich nicht kompakt angeordnet	o.b.B	im Rand- bereich nicht kompakt angeordnet	im Rand- bereich nicht kompakt angeordnet	o.b.B
Plasmazellen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	++ P
Makrophagen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Gefäß- endothel	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Retikulum- zellen	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig
Interstitium	+ / ++ H	+ / ++ H	+ / ++ H	o.b.B	+ / ++ H	++ H	o.b.B	o.b.B	++ H
Apoptosen	+ / -	+++	+	+	+ / -	+	+	-	-

Tab. 18 (Fortsetzung):

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Lymphozyten	o.b.B	o.b.B	o.b.B	sehr kompakt angeordnet	sehr kompakt angeordnet	o.b.B
Plasmazellen	++ P	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Makrophagen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Gefäßendothel	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Retikulumzellen	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig
Interstitium	++ H, + B	o.b.B	o.b.B	++ H, + B	o.b.B	+ / ++ H, + B
Apoptosen	+/-	-	-	+/-	+/-	-

Erläuterung der Abkürzungen: B: Basophile; o.b.B: ohne besonderen Befund; H: heterophile Granulozyten.

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für Apoptosen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet.
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs + / ++: 46- 60 ++: 61- 75 ++ / +++: 76- 90 +++: ≥ 91	+: 2- 5 Zellen + / ++: 6- 10 ++: 11- 15 ++ / +++: 16- 20 +++: ≥ 21	-: 0 Apoptosen + / -: 1 +: 2- 3 + / ++: 4- 5 ++: 6- 7 ++ / +++: 8- 9 +++: ≥ 10

8.3.5 Thymus

Tab. 19: Histologische Ergebnisse: Thymus

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Thymozyten	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	im Randbereich nicht kompakt angeordnet	im Rand- bereich nicht kompakt angeordnet	o.b.B	im Rand- bereich nicht kompakt angeordnet	o.b.B
Gefäß- endothel	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Hassall- Körper	einige	einige kleine	wenige sehr kleine	wenige und kleine	mehrere kleine	sehr wenige und kleine	ein sehr großes und mehrere kleine	viele kleine und größere	mehrere kleine
Makrophagen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Retikulum- zellen	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig
Interstitium	+ / + + H	+ / + + H	+ / + + H	+ / + + H	+ / + + H	+ / + + H	+ / + + H	+ / + + H	+ / + + H
Apoptosen	+ / + +	++	+++	+++	+++	++ / + + +	+ / + +	+	+ / + +

Tab. 19 (Fortsetzung):

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Thymozyten	o.b.B	o.b.B	o.b.B	am Rand sehr locker	am Rand locker nebeneinander	im Randbereich locker
Gefäßendothel	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Makrophagen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Retikulumzellen	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig	groß und blasig
Interstitium	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Apoptosen	+/++	+/++	+/++	+/-	+	+/++

Erläuterung der Abkürzungen: o.b.B: Ohne besonderen Befund; H: heterophile Granulozyten.

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für Apoptosen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet.
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs +/++: 46- 60 ++: 61- 75 ++/+++: 76- 90 +++: ≥ 91	+: 2- 5 Zellen +/++: 6- 10 ++: 11- 15 ++/+++: 16- 20 +++: ≥ 21	-: 0 Apoptosen +/-: 1 +: 2- 3 +/++: 4- 5 ++: 6- 7 ++/+++: 8- 9 +++: ≥ 10

8.3.6 GALT

Tab. 20: Histologische Ergebnisse: GALT

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Lymphozyten	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Plasmazellen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Retikulumzellen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Makrophagen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Interstitium	+++ H	o.b.B	+++ H im Kolon	o.b.B	+++ H im Kolon	++ H im Kolon	o.b.B	o.b.B	++/+++ H im kaudalem Düda
Apoptosen	+	+/++	-	+/++	+/++	+/++	+/++	+	-

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Lymphozyten	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Plasmazellen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Retikulumzellen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Makrophagen	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Interstitium	+++ H in Colon	o.b.B	o.b.B	++/+++ H in Zäkum und Kolon +/++ H in kaudalem Düda	+++ H in Zäkum	+++ H in kaudalem Düda +++ H in Zäkum
Apoptosen	+	+	-	-	-	-

Erläuterung der Abkürzungen: o.b.B: Ohne besonderen Befund; Düda: Dünndarm; H: heterophile Granulozyten.

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für Apoptosen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet.
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs +/++: 46- 60 ++: 61- 75 ++/+++: 76- 90 +++: ≥ 91	+: 2- 5 Zellen +/++: 6- 10 ++: 11- 15 ++/+++: 16- 20 +++: ≥ 21	-: 0 Apoptosen +/-: 1 +: 2- 3 +/++: 4- 5 ++: 6- 7 ++/+++: 8- 9 +++: ≥ 10

8.3.7 Respirationstrakt

Tracheal- und Bronchialepithel, Kapillarendothel, Alveolarzellen Typ I, Alveolarzellen Typ II, Alveolarmakrophagen und Interstitium ohne besonderen Befund bei I1, K2, I3, I4, K8, K11, I12, I13, I14, I16 und I17.

Tab. 21: Histologische Ergebnisse: Respirationstrakt

	30 WO P.I.	49 WO P.I.	
	K15	K10	I9
Trachealepithel	o.b.B	++ Ly/ P/ + H	+ /++ Ly/ P
Bronchialepithel	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Kapillarendothel	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Alveolarzellen Typ I	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Alveolarzellen Typ II	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Alveolarmakrophagen	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Interstitium	fokal viele H/ Ly/ P auch im Lumen	verbreitert + /++ B/ H, + Ly/ P	subepitheliales Ödem an Bronchioli und Zilienverlust

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet		Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs		+: 2- 5 heterophile Granulozyten	
+ / ++: 46- 60		+ / ++: 6- 10	
++: 61- 75		++: 11- 15	
++ / +++: 76- 90		++ / +++: 16- 20	
+++ : ≥ 91		+++ : ≥ 21	

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Zelldichte	o.b.B	o.b.B	stellen- weise sehr dicht	o.b.B	o.b.B	sehr dicht	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Sinusoide	vorwiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer	vorwiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer	vorwiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer	vorwiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer	vorwiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer	vorwiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer	vorwiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer	recht zellarm	vor- wiegend Erythro- zyten und deren Vorläufer

[illegible]

8.3.9 Niere

Tab. 23: Histologische Ergebnisse: Niere

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Tubulusepithel – proximal	sehr promiente große Zellen	o.b.B	o.b.B	teilw. opaker violetter Inhalt	o.b.B	teilw. opake violette Zylinder im Lumen	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Tubulusepithel – distal	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	teilw. opake violette Zylinder im Lumen	teilw. opake violette Zylinder im Lumen	rosa fein- granulär- erer Inhalt
Glomerula- Podozyten	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	teilw. ist das parietale Blatt verdickt
Gefäßendothel	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Mesangium- zellen	sehr prominent	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	Mesangium mit Ver- kalkungen	ggr. Proliferation	o.b.B

Tab. 23 (Fortsetzung):

	6 WO P.I.			12 WO P.I.			18 WO P.I.		
	K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16
Kapselraum	o.b.B	teilw. mit opakem, violetten Inhalt	o.b.B	ggr. opaker violetter Inhalt	teilw. sehr eng, da Glomerula gestaut	teilw. opake violetter Inhalt	in den Glomerula in denen Kristalle sind sehr eng	teilw. sehr eng	hyaline Ausgüsse
Sammelgang	Harnstau	o.b.B	ggr. hydrop-tische Degen-eration	teilw. mit Schleim gefüllt	ggr. hydrop-tische Degen-eration	o.b.B	viel Schleim	fokal ++/+++ Ly/ P/ H	o.b.B
Ureter	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	-/+ Apop.	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Interstitium	unreife Glomerula und Tubuli in der Peripherie	++ Ly/ P ++/+++ H v.a. in der Peripherie	unreife Glomerula und Tubuli in der Peripherie	++/+++ Ly/ P -/+ H/ B	unreife Glomerula und Tubuli in der Peripherie mit +/++ Ly/ P/ H	unreife Glomerula und Tubuli in der Peripherie	wenige unreife Glomerula und Tubuli in der Peripherie	wenige unreife Glomerula und Tubuli in der Peripherie -/+ Ly/ P/ H	wenige unreife Glomerula und Tubuli in der Peripherie, ggr. Ödem

Tab. 23 (Fortsetzung):

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Tubulusepithel - proximal	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	Zylinder im Lumen, teilw. dilatiert mit atrophischem Epithel
Tubulusepithel - distal	o.b.B	o.b.B	ggr. blaue homogene Zylinder	wenige Zylinder	mgr. viel Granula im Zytoplasma	deutliche Granula im Zytoplasma
Glomerulum- Podozyten	partielles Blatt verdickt	o.b.B	partielles Blatt sehr dick, Abgrenzung zwischen visceralem Blatt und Mesangiumzellen schwierig	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Gefäße	teilweise gestaut	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B

Tab. 23 (Fortsetzung):

	30 WO P.I.			49 WO P.I.		
	K15	I12	I13	K10	I7	I9
Interstitium	o.b.B	o.b.B	wenige unreifte Glomerula und Tubuli in der Peripherie	v.a am Becken Ödem	wenige unreifte Glomerula und Tubuli in der Peripherie	o.b.B
Mesangium	sehr zellreich	sehr zellreich	zellreich	o.b.B	fokal zellreich	o.b.B
Kapselraum	verengt	sehr eng	eng, opaker Inhalt	ggr. opaker Inhalt	ggr. opaker Inhalt	homogener Inhalt
Sammelgang	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B
Ureter	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B	o.b.B

Erläuterung der Abkürzungen: Apop.: Apoptose; o.b.B: Ohne besonderen Befund; B: basophile Granulozyten; ggr.: geringgradig; H: heterophile Granulozyten; Ly: Lymphozyten; mgr.: mittelgradig; P: Plasmazellen; teilw.: teilweise, v.a.: vor allem.

Skalierung für Lymphozyten und Plasmazellen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für heterophile Granulozyten: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet	Skalierung für Apoptosen: gezählt wurden fünf HPF (40er Objektiv) und daraus wurde das arithmetische Mittel errechnet.
+: 30- 40 Zellen des jeweiligen Typs + / ++: 46- 60 ++: 61- 75 ++ / +++: 76- 90 +++: ≥ 91	+: 2- 5 Zellen + / ++: 6- 10 ++: 11- 15 ++ / +++: 16- 20 +++: ≥ 21	-: 0 Apoptosen + / -: 1 +: 2- 3 + / ++: 4- 5 ++: 6- 7 ++ / +++: 8- 9 +++: ≥ 10

8.3.10 Gehirn

Purkinjezellen, Pyramidenzellen, Makroglia, Mikroglia, Ependymzellen, modifizierte Epithelzellen des Plexus corioideus, Gefäßendothel, Neuropil und Ganglien waren in der histologischen Untersuchung bei allen Tieren ohne besonderen Befund.

8.3.11 Herz

Myozyten, Interstitium, Endokard und Epikard war bei allen Tieren ohne besonderen Befund.

8.3.12 Blut

Blut, Erythrozyten, Lymphozyten, heterophile Granulozyten, basophile Granulozyten und Thrombozyten war bei allen Tieren ohne besonderen Befund.

[illegible]

[illegible]

		6 WO POST INFECTIONEM			12 WO POST INFECTIONEM			18 WO POST INFECTIONEM			30 WO POST INFECTIONEM			49 WO POST INFECTIONEM		
		K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16	K15	I12	I13	K10	I7	I9
<i>Citrobacter amalonaticus</i>	Dickdarm				++	n.u.										
	Zäkum				++											
<i>Citrobacter freundii</i>	Leber															
	Niere															
	Lunge		+													
	Dünndarm		+	(+)	n.u.	n.u.									+	
	Dickdarm		+			n.u.									+++	
	Zäkum		+										+		+++	
<i>Coliforme Keime</i>	Leber									+						
	Niere															
	Lunge															
	Dünndarm				n.u.	n.u.	+								+	
	Dickdarm					n.u.	++	++		+					+	
	Zäkum						+	+		++	+				+	
<i>Clostridium perfringens</i>	Leber															
	Niere															
	Lunge															
	Dünndarm	+	(+)		n.u.	n.u.	++	+	++	++	(+)	++		++	+	

		6 WO POST INFECTIONEM			12 WO POST INFECTIONEM			18 WO POST INFECTIONEM			30 WO POST INFECTIONEM			49 WO POST INFECTIONEM		
		K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16	K15	I12	I13	K10	I7	I9
<i>Clostridium perfringens</i>	Dickdarm	++		++	+++	n.u.	++	++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++
	Zäkum	++	+	++	+++	+++	+	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>Clostridium septicum</i>	Leber															
	Niere															
	Lunge															
	Dünndarm				n.u.	n.u.								+		
	Dickdarm					n.u.										
	Zäkum															
<i>Clostridium sordellii</i>	Leber															
	Niere															
	Lunge															
	Dünndarm	+	+++	++	n.u.	n.u.										
	Dickdarm	+++	+++	+++		n.u.										
	Zäkum	+++	+++	+++												
<i>Clostridium sp.</i>	Leber															
	Niere															
	Lunge															
	Dünndarm				n.u.	n.u.	++	++	+	++						

[illegible]

		6 WO POST INFECTIONEM			12 WO POST INFECTIONEM			18 WO POST INFECTIONEM			30 WO POST INFECTIONEM			49 WO POST INFECTIONEM		
		K11	I1	I17	K8	I3	I14	K2	I4	I16	K15	I12	I13	K10	I7	I9
<i>Proteus sp.</i>	Dickdarm											+		+++		+++
	Zäkum											(+)	+	+++		+++
<i>Pseudomonas aerogenosa</i>	Leber									(+)						
	Niere															
	Lunge															
	Dünndarm									++						
	Dickdarm							+		+				++		
	Zäkum													++		
<i>Salmonellen sp.</i>	Leber	+		+												
	Niere	++		(+)												
	Lunge	++		(+)												
	Dünndarm	+			n.u.	n.u.	(+)									
	Dickdarm	++		+	++	n.u.	(+)	(+)				+++	+++			
	Zäkum	+		+	++	++	(+)			++		+++	+			

(+): wenige; +: einige; ++ zahlreiche; +++: massenhaft; n.u.: nicht untersucht.

8.5 Ergebnisse der parasitologischen Kotuntersuchung

Tab. 25: Ergebnisse der Kotuntersuchung

	TIER	ENTAMOEBA SP. ZYSTEN	OXYUREN	MILBEN EIER*
6 Wochen p.i.	K11	++++		++
	I1	++++		(+)
	I17	++++		+++
12 Wochen p.i.	K8	+++		
	I3			(+)
	I14	++		(+)
18 Wochen p.i.	K2	++	++	++
	I4	+		
	I16	++		
30 Wochen p.i.	K15	+++		
	I12	++		++
	I13			+++
49 Wochen p.i.	K10			
	I7	++		
	I9	++		

(+): vereinzelt; +: wenig; ++ einige; +++: zahlreiche; ++++: massenhaft.

*: dieser Befund ist auf das Vorliegen eines Milbenbefalls der Futtermäuse zurückzuführen

9. Liste der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AK	Antikörper
ARV	aviären Reoviren
B	Basophile Granulozyten
bidest.	bidestillata
Blutz.	Blutzellen
BME	Basal Medium Eagle
BRV	Baboon Reovirus
°C	Grad Celsius
ca.	circa
d	Tag
DAB	Diaminobenzidion-tetrahydrochlorid
dest.	distillata
Dida	Dickdarm
diff.	differenziert
DNase	Desoxyribonuklease
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPB	Dulbecco Phosphatpuffer
ds	doppelsträngig
Düda	Dünndarm
Erys	Erythrozyten
FKS	fetales Käberserum
ggr.	geringgradig
h	Stunde(n)
H	heterophile Granulozyten
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HEF	Hühnerembryofibroblasten
hgr.	hochgradig
HPF	high power field
I	Tier aus der Infektionsgruppe

IBD	Einschlusskörperchenerkrankung der Riesenschlangen
ISVP	infektiöses subvirales Partikel
JAM	Junction-adhesions-Molekül
K	Tier aus der Kontrollgruppe
Kan	Kaninchen
kD	Kilodaltons
KID ₅₀	Kultur-infektiöse Dosis, 50 %
KI-Tupfer	Kloakentupfer
KM	Knochenmark
Ly	Lymphozyten
l	Liter
L929	Bindegewebsfibroblasten-Kultur aus der Maus
Le.	Leber
Lu.	Lunge
M	molar
mA	Milliamper
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells
mgr.	mittelgradig
Mi.	Milz
min	Minute
MKE	Mouse kidney epithelial cells
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mon	Monat
MRV	Mammalian Reoviruses
N.	Nervus
NBV	Nelson Bay Virus
NF- κ B	Nuclear Factor-KappaB
Ni.	Niere
nm	Nanometer
o.b.B.	ohne besonderen Befund
P	Plasmazellen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

137 Liste der verwendeten Abkürzungen

PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PAS	Perjodsäure-SCHIFF-Reaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PMV	Paramyxovirus
p.i.	post infectionem
PTAH	phosphotungstic acid-hematoxylin
PVC	Polyvinylchlorid
Ra-Tupfer	Rachentupfer
RM	Rückenmark
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RRV	Reptilien-Reoviren
SAF	Sodium acetate-acetic acid-formaledehyde-Verfahren
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Sek.	Sekunden
sp.	Spezies
T1L	Reovirus T1 Lang
T2J	Reovirus T2 Jones
T3A	Reovirus Typ 3 Abney
T3D	Reovirus T3 Dearing
TBS	trisgepufferte Salzlösung
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Thy.	Thymus
Tra.	Trachea
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TUF	Target unmasking fluid
v.a.	vor allem
VH2	Vipern-Herz-Zellen
ZPE	Zytopathogener Effekt
µl	Mikroliter

10. Abbildungsverzeichnis

Abb 1: Schemazeichnung einer Orthoreovirus-infizierte Zelle	5
Abb. 2: Vergleichende Orthoreovirus-Gensegmente	7
Abb. 3: Nekroseareale in IBD26/00 infizierten Lebern	59
Abb. 4: Lymphozyteninfiltration ins Darmepithel	59
Abb. 5: PAGE des original Isolates und der reisolierten Viren	63
Abb. 6: Reovirus-infizierte Zellkulturen und Kontrollzellkulturen	65
Abb. 7: TEM-Untersuchung	66
Abb. 8: Immunhistologie	68

11. Verzeichnis der Tabellen

Tab 1: Gensegmente, translatierte Proteine und deren Funktion	9
Tab. 2: Bisher an IBD erkrankte Schlangen	20
Tab. 3: Anfärbbarkeit der IBD-Einschlüsse	22
Tab. 4: Infektionsdosis der experimentell infizierten Tiere	31
Tab. 5: Infektionsdosis der infizierten Zellkulturen	42
Tab. 6: Herkunft und Anwendung der verwendeten primär- Antikörper	46
Tab. 7: Herkunft und Anwendung der verwendeten sekundär-Antikörper	47
Tab. 8: Herkunft und Anwendung der verwendeten tertiär- Antikörper	47
Tab. 9: Antigen-Demaskierung	47
Tab. 10: Untersuchte Kotproben	53
Tab. 11: Zusammenfassung der virologischen Untersuchung	61
Tab. 12: Zusammenfassung der virologischen Ergebnisse	71
Tab. 13: Gewichtsentwicklung der Versuchstiere	104
Tab. 14: Tierdaten zum Zeitpunkt der Sektion	105
Tab. 15: Histologische Ergebnisse: Magen-Darm-Trakt	106
Tab. 16: Histologische Ergebnisse: Pankreas	109
Tab. 17: Histologische Ergebnisse: Leber	111
Tab. 18: Histologische Ergebnisse: Milz	113
Tab. 19: Histologische Ergebnisse: Thymus	115
Tab. 20: Histologische Ergebnisse: GALT	117

Tab. 21: Histologische Ergebnisse: Respirationstrakt	119
Tab. 22: Histologische Ergebnisse: Knochenmark	121
Tab. 23: Histologische Ergebnisse: Niere.....	122
Tab. 24: Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchung	127
Tab. 25: Ergebnisse der Kotuntersuchung	134

12. Verzeichnis der Grafiken

Grafik 1: Mittlere Raumtemperatur in den Tierversuchsställen.....	55
Grafik 2: Mittlere Luftfeuchtigkeit in den Tierversuchsställen.....	55
Grafik 3: Gewichtsentwicklung der Tiere im Laufe des Versuchs	56
Grafik 4: Apoptosen in Milz, GALT und Thymus.....	58
Grafik 5: Vergleichende Darstellung der Entzündungszell-Infiltration und des Nachweises von Salmonellen.....	73
Grafik 6: Vergleichende Darstellung der Entzündungszell-Infiltration und des Nachweises von Entamoeba sp.	74

13. Danksagung

Danken möchte ich

Herrn Dr. Dr. Udo Hetzel für die Überlassung des Themas, Herr Prof. Dr. Manfred Reinacher für die konstruktive Kritik und allen Angestellten des Institutes für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Giessen für die freundliche Aufnahme und die Unterstützung.

meiner „virologischen“ Betreuerin Dr. Rachel E. Marschang ohne die der virologische Teil dieser Arbeit nie in der vorliegenden Form hätte entstehen können;
für die freundschaftliche Aufnahme während meiner Wochen im Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim und in Ihrem Heim.

meinen Eltern, für die jahrelange Zuversicht und Unterstützung.

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“