

2 Literaturübersicht

2.1 Stellung der Subgruppe J im Klassifikationsschema des Aviären Leukose-Sarkomatose-Komplexes

Der Aviäre Leukose-Sarkomatose-Komplex wird durch Typ C Retroviren ausgelöst. Die Sequenz der Retroviren Typ C wird, wie in Abbildung 1 gezeigt, in je ein LTR (long terminal repeat = Regelsequenz) an den Enden des Genoms, ein *gag* (internes Strukturprotein = gruppenspezifisches Antigen, gs-Ag), ein *pol* (Reverse Transkriptase Polymerase) und ein *env* (Oberflächen-Glycoprotein, gp) Gen gegliedert. Bei den oncogenen ALV ist zusätzlich noch ein *v-onc* Gen (Krebsgen) vorhanden (Liebermann 1992; Payne 1998b).



Abbildung 1: schematische Darstellung des ALV Genoms nach Liebermann (1992)

Das *gag* Gen wird auch als *gag-prt* bezeichnet, da es zusätzlich zu dem gs-Ag noch eine Protease kodiert. *Pol* entschlüsselt außer der RNA-abhängigen DNA-Polymerase zusätzlich noch eine Integrase und *env* außer dem gp85, dem globulären Bindungsprotein, noch das gp37, ein Transmembranprotein (Payne 2000a).

Payne (1998b, 2000a) gliedert die aviären Retroviren in drei für Hühner pathogene Spezies:

1. Das Virus der Aviären Leukose/Sarkomatose
(avian leukosis/sarcoma virus = ALSV)
2. Das Retikuloendotheliosevirus
(reticuloendotheliosis virus = REV)
3. Das Virus der Lymphoproliferativen Erkrankung der Pute
(lymphoproliferative disease virus = LPDV)

Die ALSV werden von ihm weiter unterteilt in:

1. Schnell transformierende Viren mit Oncogen
2. Langsam transformierende Viren ohne Oncogen

Die erste Gruppe der ALSV induziert schneller Tumoren (innerhalb weniger Tage). Charakteristisch für diese Gruppe ist das eigene virale Oncogen (*v-onc*), welches sich im Genom befindet. Die Struktur gleicht der der langsam transformierenden Viren. Das *v-onc* befindet sich in der variablen Region des Genoms. Durch den Ersatz eines Genomteiles durch das *v-onc* verlieren diese Viren ihre Replikationsfähigkeit. Hieraus resultiert, dass diese Viren unfähig sind, sich selbstständig zu vermehren und daher ein Helfervirus mit intaktem Genom zur Weiterverbreitung benötigen. Erst dann können sie zur Erkrankung führen.

Zu diesen Viren zählen folgende Stämme: MC29, CMII und OK10 mit dem Oncogen *myc* (Transkriptionsfaktoren), welche **Myeloleukose der myelomonozytären Zelllinie** verursachen.

Der Stamm BAI-A, welcher das Oncogen *myb* enthält (Transkriptionsregulator), induziert **Myeloblastose**.

Der Stamm H verursacht **Erythroleukose**, indem durch ihn das Oncogen *erbB* (Rezeptor der epidermalen Wachstumsfaktoren) aktiviert wird.

Der Virusstamm MH2 induziert **Tumorenn der myelomonozytären Stammzellen**. Ihm eigen sind zwei tumorinduzierende Gene: *myc* und *mil*. Das *myc* Gen transformiert die Zielzelle, und *mil* produziert myelomonozytäre Wachstumsfaktoren.

Weitere Virusstämme sind: ES4 (*erbA*) und AEV (*erbB*), die beide Gene der Transkriptionsfaktoren kodieren, und der Stamm E26 der Aviären Myeloblastose Viren (AMV) mit *myb* und *ets*.

Weitere akut transformierende Leukoseviren sind: Rous Sarkom Virus mit dem Oncogen *src* (Proteinkinase), Fujinami und PRCII mit *fps* (Proteinkinase), S13 mit *sea* (Rezeptor von Wachstumsfaktoren), UR2 mit *ros* (insulinähnlicher Rezeptor), Y73 und Esh mit *yes* (vinculin-ähnlicher Rezeptor) und ASV mit *jun* (DNA bindendes Protein).

Die **Myeloische Leukose** mit den beiden Formen **Myeloblastose** und **Myelozytomatose** wird durch die AMV und durch die Subgruppe J der ALV induziert. Diese Subgruppe J wird den langsam transformierenden Viren zugeordnet. Darin liegt ein Widerspruch, denn die Erkrankungen, welche durch ALV-J ausgelöst werden, entstehen ohne Helfervirus. Einige Isolate von ALV-J beinhalten ein eigenes *v-onc* (Payne et al. 1993a; Payne 1998b). Diesen Widerspruch beschreibt auch Zavala (2000). Das Virus birgt seinen Aussagen nach Eigenschaften der exogenen Viren in sich, da es sich horizontal verbreitet, enthält einen kompletten Genomsatz mit *v-onc* und wird vertikal über das Eiklar verbreitet.

Die zweite Gruppe der ALSV induziert nach längerer Inkubationszeit (Wochen bis Monate) Leukoseformen der B-Lymphozyten sowie der erythropoetischen und der myelopoetischen Zellentwicklungsreihe. Es handelt sich um einfache Viren mit der oben gezeigten Zusammensetzung: 5' *gag-pol-env3*'. Die Tumorgenese wird induziert, indem ein zelluläres Protooncogen durch einen viralen Promotor, welcher sich in der LTR Region des Genoms befindet, aktiviert wird (Payne 1998b).

Die häufigste, durch langsam transformierende ALSV ausgelöste, Erkrankung ist die **Lymphatische Leukose**, welche durch die Aktivierung des *c-myc* und *c-myb* Gens induziert wird. Eine weitere Erkrankung durch diese Virengruppe ist die **Erythroleukose**. Hierbei wird das *c-erbB* Gen in den Erythrozyten durch den viralen Promotor aktiviert (Payne 1998b).

Die ALV, welche für Hühner pathogen sind, werden auf Grund unterschiedlicher Hüllantigene in 6 Subgruppen (A bis E und J) eingeteilt. Mit Ausnahme der Subgruppe E verbreiten sich

diese Viren alle sowohl horizontal als auch vertikal und werden den exogenen Viren zugeordnet. Die Subgruppe E gehört zu den endogenen Viren und verbreitet sich ausschließlich vertikal.

Die Hüllantigene werden durch das Gen *env* kodiert, welches das gp85 (Oberflächenantigen) und das gp 37 (Transmembranprotein) entschlüsselt (Payne 1998b).

Die Viren der Subgruppe E werden durch die Keimzellen, in deren Genom sie sich befinden, weiterverbreitet. Es handelt sich um inkomplette Viren, denen die Fähigkeit der Replikation fehlt. Diese Gruppe ist auf Grund der schwachen Promotor-Aktivität in der LTR Sequenz apathogen (Payne 1998b).

Weitere Familien der endogenen aviären Viren (EAV) sind bekannt. Eine dieser Familien ist nah verwandt mit der Subgruppe J. Es handelt sich um E51. Diese Familie wird nach Benson et al. (1998b) den endogenen Viren zugeordnet. Weitere aviäre endogene Viren sind: ALVE, CR1 und ART-CH (Smith et al. 1999).

Andere Autoren bevorzugen eigene Taxonomien, welche sich auf anderen Kriterien stützen. Murphy et al. (1999) fassen z. B. die Aviären Retroviren, wie in Tabelle 1 gezeigt wird, folgendermaßen zusammen:

1. schnell transformierende Viren
2. langsam transformierende Viren
3. Viren, die ein Helfervirus zur Replikation auf Grund eines inkompletten Gens brauchen
4. komplette Viren, welche vollständig zur Replikation befähigt sind

Tabelle 1: Einteilung der Aviären Retroviren nach Murphy et al. (1999)

Syndrom	Tumorwachstumsrate	Virales Oncogen	Zielzelle	Läsionstyp
Zur Replikation befähigte Viren (Aviäre Leukose Viren)				
Lymphoide Leukose	langsam	-	Lymphoblasten	Infiltration von lymphoiden Zellen in verschiedenen Organen
Osteopetrose	langsam	-	Osteoblasten und Osteoklasten	Aktivierung von Osteoblasten
Nierentumoren	langsam	-	Nierenzellen	Nephroblastom, Karzinom
Zur Replikation nicht befähigte Viren (Erythroblastose, Myeloblastose, Myelozytomatose)				
Erythroblastose	schnell	v-erb	Erythroblasten	Anämie
Myeloblastose	schnell	v-myb	Myeloblasten	Anämie, Leukämie
Myelozytomatose	schnell	v-myc	Myelozyten	Karzinome, Sarkome
Hemangiom	schnell	?	Kapilläre Endothelzellen	Hämangiom
Sarkome	schnell	v-fps, v-yes	Verschiedenen mesenchymale Zellen	Sarkom, Karzinom
Zur Replikation befähigte, schnell transformierende Viren (Rous Sarkom Virus)				
Sarkome	sehr schnell	v-scr	Verschiedenen mesenchymale Zellen	Sarkom

Eine neue Taxonomie, welche auf dem „Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses“ beschlossen wurde, beschreiben van Regenmortel et al. (2000). Hierin gehören die Aviären Retroviren zu den ssRNA-Viren, welche 7 Genera beinhalten:

1. Genus Alpharetrovirus
2. Genus Betaretrovirus
3. Genus Gammaretrovirus
4. Genus Deltaretrovirus
5. Genus Epsilonretrovirus
6. Genus Lentivirus
7. Genus Spumavirus

Der folgende Stammbaum (Abbildung 2) wurde nach diesen Angaben und nach Veröffentlichungen der Internetseite http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/fs_retro.htm, welche sich ebenfalls nach diesen Angaben richteten, modifiziert.

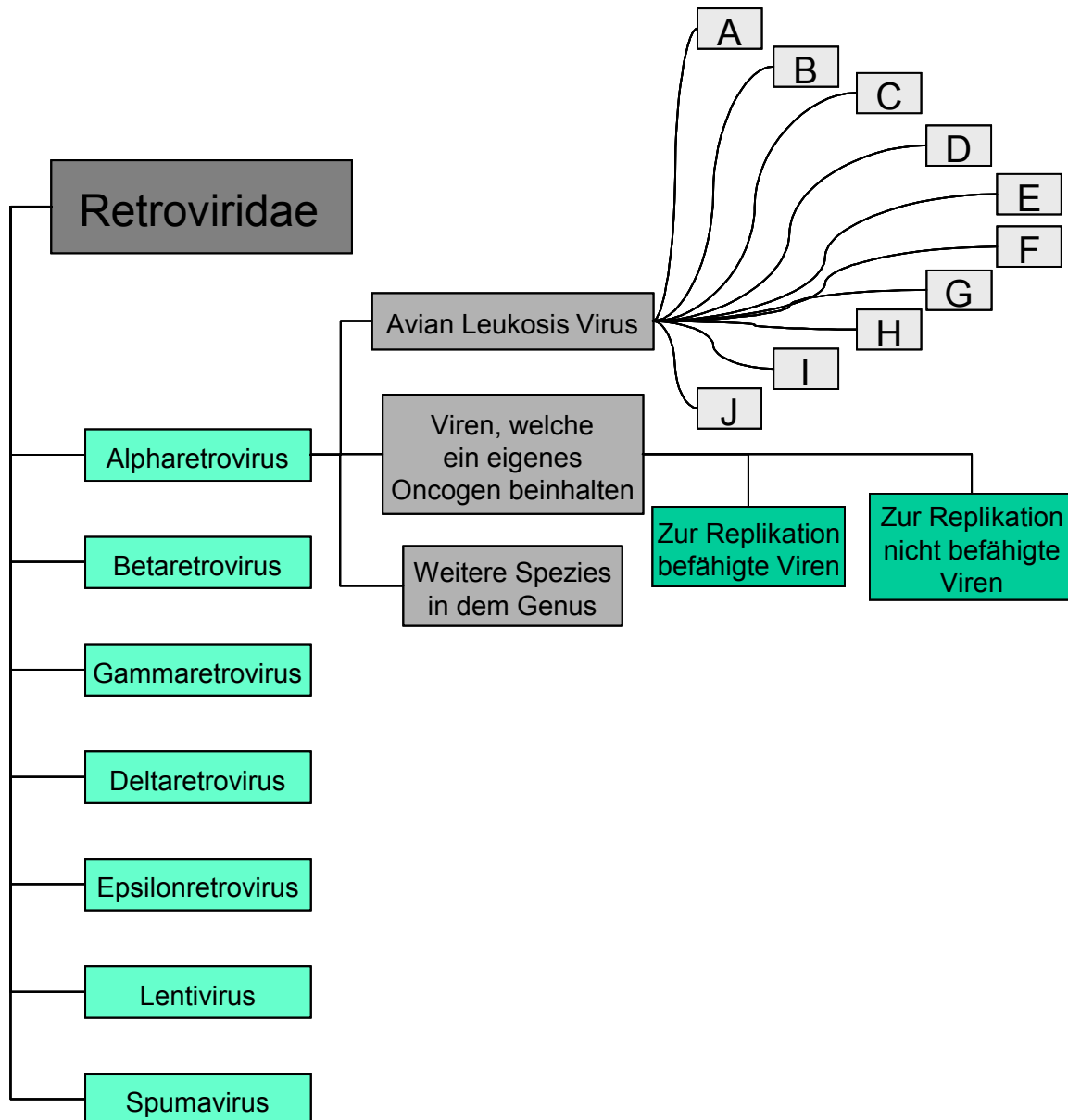


Abbildung 2: Stellung der Subgruppe J im Schema der Aviären Retroviren modifiziert nach van Regenmortel et al. (2000)

Allen 7 Genera gemein ist, dass sie die reverse Transkriptase, ein Enzym, welches die einsträngige RNA in mehrschichtigen Prozessen in komplementäre DNA umschreibt, beinhalten.

Die Alpharetroviren werden dadurch gekennzeichnet, dass ihr Virion eine C-Form aufweist und wenig sichtbare Spikes auf der Oberfläche enthalten sind. Weiterhin beinhalten sie ein zentral gelegenes, kondensiertes Core. Das Kapsid dieser Viren wird bei dem Budding-Prozess vervollständigt (van Regenmortel et al. 2000).

Die in dieser Arbeit verwandte Systematik richtet sich nach den Arbeiten von Payne (1998b, 2000b).

2.2 Historisches zur Etablierung der Subgruppe J

Erstmals untersuchte Payne 1977 einen Tumor, welchen er zur Diagnostik von einem kommerziellen Broilerunternehmen zugesandt bekam, mit Veränderungen, wie sie bei der Myelozytomatose vorkommen. Diese Erkrankung war bis dahin in England selten und erweckte demzufolge großes Interesse. Intensive Forschung blieb jedoch vorerst noch aus.

11 Jahre später (1988) vermutete Payne, nach mehrmaligem Auftreten ähnlicher Tumoren, das Vorhandensein einer neuen Manifestation einer ALV-Infektion. Die neue Virusvariante der Aviären Leukoseviren kam vermehrt im Vereinigten Königreich vor, sie war jedoch noch nicht klassifiziert. In dieser Zeit waren weitere Fälle mit einer derartigen Infektion und ähnlichen Erkrankungen in Europa bekannt geworden (Gavora et al. 1980; Payne 2000b). In den USA trat die Erkrankung erstmalig in den frühen 90er-Jahren auf (Fadly und Smith 1997). Die meisten Tierverluste waren zwischen 1997-98 weltweit festzustellen (Payne 2000b). Zu dieser Zeit wurde am intensivsten über ALV-J geforscht.

Weiterhin wurde von der Broilerindustrie ein erhöhtes Vorkommen von gruppenspezifischem Antigen (gs-Ag) von ALV im Eiweiß der Eier und in Vaginalabstrichen der Elterntiere ermittelt. Diese Ag wurden mittels Enzym-Immunoassay (ELISA) gefunden (Payne und Howes 1991).

Payne untersuchte mit seiner Forschungsgruppe die Viren und versuchte sie in die bisher bekannten Subgruppen der ALV einzuordnen. Dies gelang nicht, und so beschrieb er sie Ende der 80er-Jahre als HPRS-100 bis HPRS-104 (Payne et al. 1991). Diese fünf Virusstämme schienen gleich zu sein, sodass HPRS-103 als Prototyp einer neuen Subgruppe der ALV definiert wurde. Diese Subgruppe wurde zunächst vorsichtig als neue Envelope Subgruppe J bezeichnet. Nach Infektionsversuchen an der Hühnerlinie 15 I wurde das Virus vorerst als gering pathogen eingestuft. Später erkannte die Forschungsgruppe, dass in der Linie 15 I Myeloische Leukose (ML) seltener vorkommt, das Auftreten von Lymphatischer Leukose (LL) jedoch häufig ist. Somit wurden weitere Infektionsversuche an Masthühnchen vorgenommen, welche eine hohe Inzidenz für ML aufwiesen. Die Eigenschaften des neuen Subtyps J beschrieben Payne und Mitarbeiter (Payne et al. 1991a; Payne et al. 1991b).

2.3 Molekulare Eigenschaften von ALV-J

Die ALV gehören zu den Typ C Retroviren, welche eine Größe von etwa 100nm aufweisen. In dem im Inneren gelegenen Core befinden sich zwei identische RNA Kopien, die Reverse Transkriptase (RT), die Integrase und die Protease. Die provirale DNA enthält dieselbe Basenreihenfolge wie die RNA (Venugopal 1999).

Gp85 (Oberflächenbindungsprotein) und gp37 (Transmembranprotein) sind Untereinheiten eines Proteins, welches auf der Oberfläche des Virus die Bindung zwischen Erreger und Wirtszelle ermöglicht. Das Gen *env* kodiert diese Proteine. Gp85 ist 85 kD schwer, hat eine runde Oberfläche und induziert die Bindung zwischen dem Transmembranprotein gp37 und der Wirtszelle (Venugopal 1999). Ohne diese Bindung ist eine Infektion des Wirtes nicht möglich (Zavala 2000). Die Region des *env* Gens der ALV-J ist zwischen 93 und 106 Basenpaare kürzer als die entsprechende Region der anderen ALV (Payne 1998a).

Dieses Gen weist eine hohe Homologie (75%) zu den defekten *env* Genen der E51 auf. E51 gehört zu der Familie der endogenen Viren (EAV). Die Homologie zu dem *env* Gen anderer Subgruppen ist geringer (40%) (Benson et al. 1998b). Es gibt somit Hinweise darauf, dass ALV-J eine genetische Rekombinante von EAV ist (Payne 1998a).

Endogene aviäre Viren sind normale Bestandteile des Wirtsgenoms und werden durch beide Geschlechter weitervererbt (Payne 2000a). Ihre Onkogenität ist gering (Payne und Fadly 1997).

Die Homologie des gp85 der Subgruppen A-E liegt zwischen 80 und 85% (Payne 1998a). Eine Diagnosemöglichkeit zur Unterscheidung der Subgruppen bieten Pham et al. (1999). Diese Arbeitsgruppe entwickelte eine RT-PCR, mit welcher die Subgruppen A-E detektiert werden können.

Die meisten Unterschiede zwischen ALV-J und EAV werden in den variablen Regionen des *env* Gens gefunden (Bai et al. 1995a; Bai et al. 1995b; Weikel et al. 2000). Benson et al. (1998b) verifizieren dies und beschreiben eine Homologie von 84% zwischen dem Sequenzteilstück 251-289 der terminalen 43sten Aminosäure von ALV-J und EAV. Die anderen Gene des ALV-J weisen keinerlei Homologien zu den Subgruppen A-E auf.

Neuere Untersuchungen ergaben, dass eine 97%ige Übereinstimmung von Teilen des *env* Gens (5'Ende der LTR-Region mit U5 und R sowie das 5'Ende der mutmaßlichen *gag* Region) des HPRS-103 Virus mit den entsprechenden Teilen des *env* Gens von Subgruppen der EAV, dem EAV-HP (= ev/J) und einer neueren Variante der ALV-J (dem ART-CH) besteht. Somit besteht eine genetische Verwandtschaft zwischen HPRS-103 und den ALV in den Genen *pol* und *gag* sowie eine genetische Verwandtschaft im Gen *env* zu den endogenen retroviralen Elementen von EAV-HP und ART-CH. Weiterhin wurde gezeigt, dass die U3-Region der LTR-Sequenz Unterschiede zu den entsprechenden Sequenzen der

anderen ALV aufweist (Smith et al. 1999). Die U3 Region weist eine schwache Promotor-Aktivität auf (Bai et al. 1995b; Smith et al. 1999; Payne 2000a; Sacco et al. 2000). Die *pol* Region von ALV-J ist zu über 90% mit der Region der anderen ALV identisch, obwohl sie auf Grund eines verfrühten Stop-Kodons weniger Basenpaare beinhaltet (Venugopal 1999).

Aus diesen und weiteren Arbeiten ergibt sich die in Abbildung 3 gezeigte Genomstruktur für ALV-J:

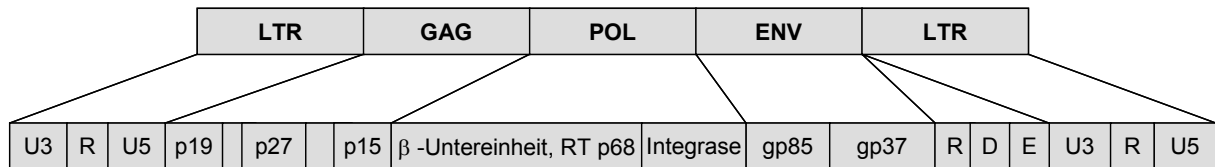


Abbildung 3: Genomstruktur von ALV-J modifiziert nach Silva et al. (2000) und Sacco et al. (2000)

Die *gag* und *pol* Gene von ALV-J weisen eine 96-97%ige Homologie zu den Subgruppen A, C und D auf (Payne 1998a). Das *pol* Gen dekodiert die Reverse Transkriptase, welche die Transkription der RNA in die DNA bewirkt (Payne 1998b).

ALV-J besitzt ein E-Element in der 3' nicht kodierten Sequenz, welches sonst nur bei akut transformierenden, kompletten Viren zu finden ist (Payne 1998a).

Der Prototyp HPRS-103 besitzt kein eigenes Oncogen. Diese Tatsache stimmt mit den langsam transformierenden Eigenschaften dieses Virus überein (Payne 2000b).

2.4 Mutationen von ALV-J

Untersuchungen mit Sequenzanalysen von Feldisolaten zeigten, dass sowohl Punktmutationen als auch Chromosomenmutationen bei diesem Virus vorkommen (Payne et al. 1993a; Smith et al. 1998b; Venugopal et al. 1998; Payne 2000a).

Während bei den Subgruppen A-E eine große Variabilität in den Regionen hr1 und hr2 (lange hypervariable Regionen) sowie in den Regionen vr1, vr2 und vr3 (kurze variable Regionen) besteht, zeigen sich die meisten Genveränderungen bei ALV-J in den Regionen hr1, hr2 und vr3. Die Region vr1 ist bei ALV-J nicht vorhanden. Bei der Sequenz des *env* Gens, das gp 37 kodiert, besteht eine 67%ige Homologie zu den anderen Subgruppen. Diese stimmen untereinander zu 92-95 Prozent überein (Payne 1998a).

Venugopal et al. (1998) fanden 12 unterschiedliche Isolate von HPRS-103 bei Untersuchungen von Hühnern und bezeichneten sie als X1 bis X12. Nur zwei dieser Isolate konnten in serologischen Testverfahren mit HPRS-103-spezifischem Antiserum neutralisiert werden. Es handelt sich bei den anderen Isolaten um Mutanten, welche im *env* Gen Veränderungen aufweisen. Diese Mutationen ereigneten sich mutmaßlich durch die Selektion und Anpassung an die Wirtszelle. Sequenzanalysen zeigten eine Homologie von 92,3 bis 98,8% mit HPRS-103.

Benson et al. (1998b) wiesen nach, dass zufällig ausgewählte und untersuchte englische und amerikanische Feldisolate von ALV-J von ein und demselben Virusvorläufer abstammten. Sie unterscheiden sich jedoch in der Aminosäuresequenz des gp85, welches vom *env* Gen kodiert wird. Auch Silva et al. (2000) untersuchten amerikanische Feldisolate und verglichen diese mit dem europäischen Vorläufer HPRS-103. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die amerikanischen Isolate Ähnlichkeiten zu exogenen ALV aufwiesen und eine 97,5%ige Ähnlichkeit zu Sequenzen von Genomen aus der Linie 0 zeigten. Ein Merkmal der Linie 0 ist die Resistenz gegen Infektionen mit dem endogenen Stamm E der ALV. Die Homologie wurde anhand von Sequenzstudien gezeigt, welche mit Hilfe von PCR-Verfahren durchgeführt wurden. Daraus schlussfolgerten die Autoren, dass das exogene ALV-J eine Rekombinante von exogenen ALV ist und Sequenzstücke von dem endogenen Stamm 0 besitzt (Silva et al. 2000).

Eine neuere Variante von HPRS-103 beschrieben Fadly und Smith (1997). Sie untersuchten vier Wochen alte Masthühnchen, welche an ML erkrankt waren. Die neue Variante des Virus bezeichneten sie als ADOL-Hc1 (Avian Disease & Oncology Laboratory). Ak-Tests zeigten, dass Ak gegen diese Variante zwar HPRS-103 neutralisierten, es aber umgekehrt nicht der Fall war.

Hunt et al. (1999) suchten nach neuen Testverfahren, mit denen die Subgruppe J klassifiziert werden sollte. Eine Zelllinie genetischen Ursprungs von mit ADOL-Hc1 infizierten Tieren (DF-1J) zeigte Resistenzen gegenüber HPRS-103. In Folge dessen könnte diese Zelllinie zur Identifikation von Untergruppen der ALV-J eingesetzt werden.

Durch Mutationen resultierten Antigenvariationen, die teilweise schneller tumorbildend waren (Payne 1998a; Venugopal et al. 1998; Venugopal 1999). Dies führte dazu, dass die bisherigen Testverfahren nicht mehr einsetzbar waren bzw. nicht mehr ihren gewünschten Erfolg erzielten. Diese Mutationen ereignen sich nicht nur im *env* Gen, sondern können auch anderswo einsetzen.

Die hohe Mutationsrate, das Fehlen von genetisch resistenten Hühnerlinien und das breite Wirtsspektrum von ALV-J erschweren die Klassifizierbarkeit von Feldisolaten (Bai et al. 1995a).

Einen Beweis für die schnelle Mutationsrate des Subtyps J ergibt eine Untersuchung von 198 virämischen Tieren. 16 dieser Tiere zeigten positive PCR- Ergebnisse mit den Primern H5 und H2 (HPRS-103 ähnliche Viren) und 176 mit H5 und H7 (neuere Isolate von ALV-J und HPRS-103). Die 22 Tiere, welche nicht detektiert wurden, waren an einer Infektion mit neu mutierten Viren erkrankt (Payne 1998a).

Die hohe Mutationsrate wird durch Selektion der nichterkannten, mutierten Gene durch das Programm zur Elimination des Virus zugeschrieben. In diesem Tilgungsprogramm werden

tolerante Hühner, welche das Virus vertikal ausbreiten, schneller eliminiert als immune Tiere, welche das Virus horizontal verbreiten (Payne 1998a).

Die genetischen Eigenschaften der Retroviren verändern sich häufig durch Punktmutationen. Diese Mutationen ereignen sich vielfach im *env* Gen. Hierdurch wird die Wirtszellenimmunität beeinträchtigt, da das *env* Gen die Hüllantigenität beeinflusst. Die ALV haben auf Grund des Fehlens eines Kontrolllese-Mechanismus des Gens die höchste Mutationsrate dieser Virusfamilie (Payne 2000a).

Seit 1997 wurden von Venugopal und Mitarbeitern in kommerziellen Geflügelbeständen Feldisolate gewonnen, die sowohl Erythroblastose als auch ML induzieren. Diese Isolate (mit dem Gen *erbB*) wurden den schnell transformierenden Viren zugeordnet (Venugopal et al. 2000a). Dies deckt sich mit den Aussagen von Payne (2000b), der die Weiterverbreitung von ML durch *erbB* vermutet, steht aber im Gegensatz zu den eingangs erwähnten Arbeiten, welche ALV-J zu den langsam transformierenden Viren zählen.

Weitere akut transformierende ALV besitzen Oncogene und können Myeloische Leukose verursachen (Murphy et al. 1999). Zum Beispiel beinhaltet MC29 das Oncogen *myc* (Myelozytome), und AMV beinhaltet das Oncogen *myb* (Myelozytoblastose) (Graf und Beug 1978). Diese Viren induzieren jedoch nach kürzerer Inkubationszeit Tumoren und unterscheiden sich dadurch von dem Stamm J (Payne et al. 1993a). Diese Viren stellen nach Payne eine weitere, offensichtliche Möglichkeit der Weiterverbreitung von ALV dar, die noch zu klären ist (Payne 2000b).

Hunt et al. (1999) beziehen sich ebenfalls auf die Schwierigkeiten der Interaktionen der unterschiedlichen Subgruppen. Die Autoren schlussfolgern, dass in den Entstehungsprozessen der Erkrankungen die Faktoren und Kombinationen der Subgruppen noch unklar sind.

In der Erforschung der Lymphatischen Leukose (LL) ist eine Interaktion zwischen endogenen und exogenen Viren schon bekannt (Crittenden 1987). Fynan et al. (1993) zeigten, dass bei mit ALV infizierten Hühnern eine höhere Rate von LL nachweisbar war, wenn sie mit einem nicht-oncogenen Stamm (SB-1) gegen Marek geimpft wurden. Bei Hühnern, welche nur ALV positiv getestet wurden, war die Infektionsrate niedriger. Nach Meinung der Autoren beschleunigt das kombinierte Auftreten beider Viren (des Herpesvirus der Marekschen Krankheit und der ALV) die Entstehung der Krankheit LL.

2.5 Pathogenität von ALV-J beim Huhn

Vier mögliche Angriffspunkte der Viren, welche aviäre Leukose auslösen, sind in der Wirtszelle bekannt und von Payne (2000) beschrieben:

1. Wachstumsfaktoren
2. Rezeptoren der Wachstumsfaktoren
3. Kernfaktoren
4. Signaltransduktoren

Bei Pathogenitätsversuchen mit HPRS-103 kam Payne (1998a) zu der Erkenntnis, dass eine embryonale Infektion mit ALV-J eine Gewichtsreduktion zur Folge hat, dies aber nicht der Fall ist, wenn die Infektion nach dem Schlupf erfolgt.

In weiteren Experimenten mit embryonal infizierten Masthühnchen wurde die Erkrankung von Payne und Mitarbeitern genauer studiert. 1/3 der infizierten Tiere litt an ML. Wenige davon bekamen renale Adenome oder andere Tumoren. Im Mittel starben die Versuchstiere in der 20ten Lebenswoche. Das jüngste Huhn, welches an den Folgen der Infektion starb, war 9 Wochen alt. Nach Kontaktinfektionen war das Auftreten der Tumoren seltener. Lymphatische Leukose wurde nicht diagnostiziert. Nach diesen Ergebnissen wurde das Virus ALV-J als „slow-onset“ (langsam krankmachend) eingestuft. Die Tumorgenese benötigt ein zelluläres Protooncogen. Zellen von Knochenmarkskulturen werden von diesem Virus nicht transformiert (Payne 1998a; Payne et al. 1991; Payne et al. 1993a).

Versuche an verschiedenen Hühnerlinien zeigten, dass das Auftreten von ML unterschiedlich ist. Die Linie O der Rasse Leghorn wies eine Häufigkeit von 17% bei embryonal infizierten Hühnern auf, die Linie BrL 11%, 61 4% und 15 I sowie N 0%. Payne schlussfolgerte, dass ML und renale Tumoren bei Masthühnchen häufiger vorkommen, als bei anderen Hühnerzuchtlinien (Payne 1998a; Payne 2000b).

Auf Grund des Fundes von ALV-J im Herzen von Hühnern wurde die Beziehung zwischen einer ALV-J-Infektion und dem Vorkommen von Aszites geprüft. Es zeigte sich bei infizierten Tieren jedoch weder eine Veränderung der Herzen in der Masse noch im Größen-Massenverhältnis (Payne 2000b).

2.6 Zelltropismus

ALV-J bindet zum großen Teil an Zellen der myeloischen Entwicklungsreihe (Payne et al. 1992).

Payne (1996) sowie Arshad und Mitarbeiter (1997) erzielten mit Hilfe der Immunhistochemie, *in situ* Hybridisierung und der Elektronenmikroskopie folgende Ergebnisse: Bei tolerant virämischen Tieren konnte in vielen Organen gp85 nachgewiesen werden. Hauptsächlich kamen ML und selten Sarkome vor. Die Forscher fanden das Virus in den Nebennieren, im

Herzen, in den Nieren, im Muskelmagen, in der glatten Muskulatur und im Bindegewebe. Bei den verschiedenen Hühnerlinien war kein Unterschied im Zelltropismus festzustellen.

Der Zelltropismus von HPRS-103 wird durch die Promotor- und Enhancer-Sequenz des Virus bestimmt. Diese in der LTR-Sequenz liegenden Regionen unterscheiden sich von anderen ALV. Da die virale Onkogenität die zelluläre durch Enhancer und Promotor beeinflusst, legte dies die Vermutung nahe, dass es keinen Zusammenhang zwischen der viralen Replikation und der Onkogenität des Virus gibt (Payne 2000b).

Der Tropismus von ALV-J zur Bursa Fabricii ist gering. Dies kann Anhaltspunkte dafür geben, warum ALV-J keine Lymphatische Leukose verursacht (Payne 1998a). Der Tropismus zu kultivierten Blutmonozyten ist hingegen hoch. ALV-J kann sich solange in Blutkulturen replizieren, wie Monozyten oder Myelozyten vorhanden sind (Payne 1998a). 1991 untersuchten Payne und Mitarbeiter, ob HPRS-103 und weitere ALV, welche von Infektionsversuchen oder aus Feldisolaten stammten, Knochenmarkskulturen transformieren können. Da HPRS-103 dazu nicht in der Lage war, schlussfolgerten die Forscher, dass diesem Virus das Oncogen zur Transformation von Zellen fehlt, es also zu den inkompletten Viren zählt (Payne 2000b). Die Unfähigkeit des Virus, sich in Säugetierzellen zu vermehren oder diese zu transformieren, wiesen Payne et al. (1991b) nach.

Später wurde gezeigt, dass 10 von 17 Isolaten, welche experimentell durch HPRS-103 erzeugt wurden, Zellen von Knochenmarkskulturen transformieren konnten. Diesen Stämmen wurde ein virales Oncogen zugeschrieben, und sie wurden zu den schnell transformierenden Viren gezählt, da die Transformation innerhalb von 14 Tagen erfolgte. Somit wurden ALV-J-Virusstämme aufgezeigt, die in der Lage waren, selbstständig, ohne Helfervirus, Zellen zu transformieren (Payne et al. 1993a).

Eine Feldstudie bestätigte die Veränderung der Viruseinstufung von den inkompletten zu den kompletten Viren. Während dieser Studie wurden vier Fälle von akut transformierenden Isolaten des ALV-J Stammes bekannt. Payne vermutete, dass diese Stämme ein Oncogen durch Transformation der zellulären Protooncogene erhalten haben. Vergleiche mit bekannten Oncogenen ließen vermuten, dass es sich bei diesem neuen viralen Oncogen um *myc* handelt (Payne 1998a).

Bei weiteren Versuchen wurde eine Auswahl von akut transformierenden Viren, welche ML oder andere Neoplasmen auslösten, in Eintagsküken inokuliert. Auf diese Weise zeigte sich, dass diese akut transformierenden Viren erst bei der Entstehung von ML während der Transduktion der Oncogene von den endogenen Viren entstanden. Über die Beschaffenheit und die Eigenschaften der akut transformierenden Viren sowie über deren Ausbreitung ist noch wenig bekannt (Payne 2000b).

2.7 Pathogenität gegenüber anderen Vogelspezies

Bei einem Versuch, in dem Payne und Mitarbeiter die Pathogenität von HPRS-103 gegenüber 12 unterschiedlichen Vogelarten testeten, wurden verschiedene Zellkulturen von Fasanen, Enten, Wachteln, Truthühnern, Gänsen und Hühnern untersucht. Nur die Kulturen der Hühnerlinien und der Putenlinien waren empfänglich für eine Infektion. Die Forschungsgruppe folgerte daraus, dass der Rezeptor auf den Zielzellen der Truthühner ähnlich denen der Hühnerlinien sein muss. Dies ist auf die phylogenetisch engere Verwandtschaft der Truthühner mit den Hühnern als mit den anderen untersuchten Vogelarten zurückzuführen (Payne et al. 1992).

In einer weiteren Studie wurde experimentell gezeigt, dass Puten empfänglich auf eine Infektion mit dem Stamm HPRS-103 und 966 reagieren. Beide Virusstämme wurden in Eintagsküken inokuliert, und diese wurden mit nicht infizierten Brutgeschwistern zusammen gehalten. In der mit dem Stamm HPRS-103 beimpften Gruppe konnten nach 10 Wochen keine Tumorenn nachgewiesen werden. Es wurden jedoch Ak gefunden. Der Stamm 966 erzeugte nach vier Wochen pathohistologische Veränderungen von Myelozytomatose. Weiterhin wurde in diesem Versuch gezeigt, dass auch bei Puten die Übertragung von ALV-J horizontal möglich ist (Venugopal et al. 2000b).

Während einer Versuchsreihe von Prusas und Hafez (2000), in der 16 Putenbestände auf das Vorhandensein von gp85 Ak und gp27 Ag hin untersucht wurden, konnten mit einem serologischen Testkit keine positiven Ergebnisse erzielt werden. Es wurden in diesen Beständen auch keine Tumorenn festgestellt. Bei der Testung von Serumproben der Putenbestände waren zwischen 0,7 und 1,3% der serologisch untersuchten Proben positiv. Da es aber auch zu unspezifischen positiven Reaktionen kommen kann, gehen die Autoren davon aus, dass eine ALV-J Infektion in der deutschen Putenhaltung ohne Bedeutung ist. Sie geben aber zu bedenken, dass experimentell eine Infektion von Putenembryofibroblasten möglich ist.

2.8 Epidemiologie

Die horizontale und vertikale Übertragung von ALV wurde von Fadly und Okazaki (1982) gezeigt.

Das Auftreten unterschiedlicher Tumorenn, ausgelöst durch ALV-J, in den verschiedenen Hühnerrassen variiert beträchtlich. Myeloische Leukose wird vor allem bei adulten Hühnern beobachtet, kann aber auch schon bei vier (Witter 1997; Fadly und Smith 1999) bis fünf Wochen alten Hühnern vorkommen (Payne et al. 1992).

Es gibt im Gegensatz zu anderen ALV keine Anhaltspunkte für eine genetische Resistenz der unterschiedlichen Hühnerrassen gegenüber ALV-J (Payne 1998a).

ALV-J wird horizontal und vertikal übertragen (Payne et al. 1992; Payne 1998a). Nach einer Infektion der Elterntiere können virämische Küken, welche permanent immunologisch tolerant und Ak negativ sind, folgen. Diese Tiere werden zu Ausscheidern und neigen eher zur Ausbildung von ML oder anderen Tumoren als kontaktinfizierte Tiere (Payne 1998a). Im Mekonium dieser Tiere befindet sich Virusmaterial, welches zur horizontalen Übertragung beiträgt (Venugopal 1999). Feldversuche zeigen, dass eine horizontale Ausbreitung bei Fleischrassen häufiger ist als bei Hühnern der Rasse „white leghorn“ (Fadly 2000).

Je nach Linie reagieren Hühner, welche nach dem Schlupf infiziert werden, unterschiedlich. Die Linie BrL reagiert Ak positiv und scheidet gag mit dem Eiweiß, aber nicht über die Kloake aus (V-A+). Diese Tiere bilden keine Tumoren aus. In den Linien 20 und 21 reagieren die Tiere unterschiedlich. Einige werden zu permanent tolerant virämischen Tieren (V+A-), andere bilden nach einer flüchtigen Virämie eine Immunität aus (V-A+) (Payne et al. 1993a; Payne 1998a). Bei den V+A- Tieren ist die Toleranz solange unvollständig, wie in der Milz noch keine Ak-produzierenden Zellen zu finden sind. Bis zu diesem Zeitpunkt sind neutralisierende Ak im Serum nachweisbar (Russell et al. 1997). Die Toleranz der Tiere hängt somit von dem Hühnerstamm und zu einem kleineren Teil von der Infektionsdosis ab (Witter 1997).

Bei Masthühnchen, welche frühzeitig mit dem Virus in Kontakt treten, kommt es nach einer flüchtigen Virämie zur Antikörperproduktion. Diese Tiere können ebenfalls tolerant virämisch werden. Dies wird in Abbildung 4 dargestellt (Fadly und Smith 1999). Die immunen Tiere werden zu Ausscheidern (Payne 1998a; Payne 2000b).

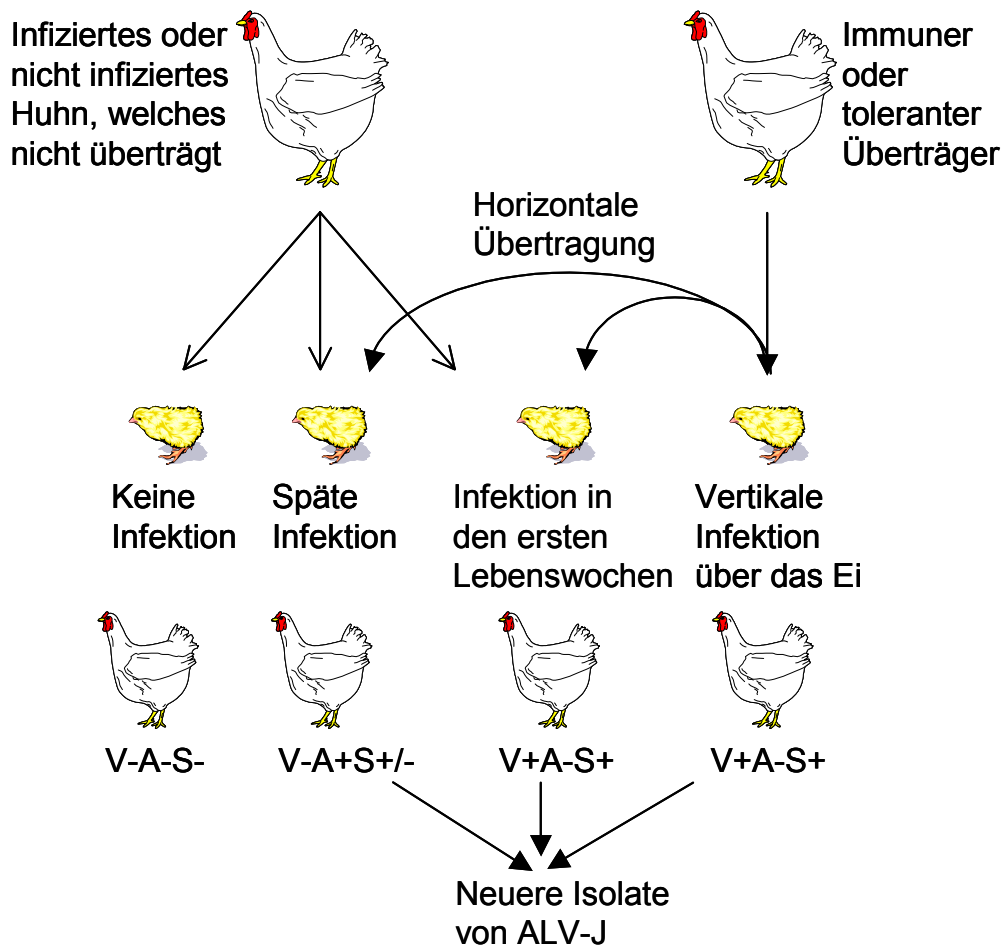


Abbildung 4: Übertragung von ALV-J und Entstehung von neueren Isolaten nach Venugopal (1999). V = Virämie, A = Ak-Produktion, S = Ausscheider

Auf Grund dieser Ergebnisse folgert Payne, dass bei Tilgungsprogrammen von ALV-J die Expression der endogenen aviären Viren (EAV) von verschiedenen Hühnerrassen und -linien eine Rolle spielen kann. Die Empfänglichkeit der Tiere gegenüber exogenen Viren (möglicherweise eine Toleranz) werde dadurch beeinflusst (Payne 2000b). Bacon (2000) argumentiert auf gleiche Weise, wenn er von einer Interaktion zwischen EAV und ALV, welche eine immunologische Toleranz gegenüber den oncogenen ALV bewirkt, spricht. Smith et al. (1999) vermuten, dass die unterschiedliche Ausbildung des EAV-HP (einem Bauteil des Genoms der ALV) im *env* Gen bei Fleischrassen eine Toleranz gegenüber einer ALV-J Infektion induzieren könnte.

Gorbovitskaia et al. (1998) zeigten die Vielfalt der Genomunterschiede der ALV-E. In molekularbiologischen Studien führten sie 12 unterschiedliche loci im Subtyp E an. Sie zeigten, dass sich in vielen Hühnergenen retrovirale DNA finden lässt, die der DNA von exogenen Viren ähnelt. Diese DNA stufen die Autoren als ALV-E-Familie der endogenen viralen (ev) Gene ein.

Eine Verbreitung von *gag* korreliert mit einer Verbreitung der ALV-J Infektion (Payne und Fadly 1997). Demzufolge schlägt Payne vor, von den Elterntieren Vaginalabstriche und Eiweißproben auf das Vorhandensein von gruppenspezifischen Ag der ALV-J zu

kontrollieren. Diese Ergebnisse könnten dann für ein Ausmerzungsprogramm zur Bekämpfung von ALV-J genutzt werden. Ein solches Verfahren enthält folgende Schritte:

1. 20 Wochen alte weibliche Hühner werden mit einem ELISA auf *gag* überprüft.
2. 22 Wochen alte Hühner beider Geschlechter werden auf Ak und Virus hin untersucht. Virämische Tiere werden entfernt.
3. In der 23ten Woche werden Proben von den ersten beiden Eiern der Tiere auf das Vorhandensein von *gag* hin untersucht (ELISA).
4. In der 26ten Woche wird das Mekonium des ersten Kükens jeder Henne auf das Vorhandensein von *gag* mit einem ELISA getestet.
5. In der 40ten Woche wird dies wiederholt.

Positiv getestete Tiere werden jeweils ausgesondert.

In einem 6-jährigen Versuch konnte so das Vorhandensein von *gag* in Vaginalabstrichen von 50% auf 5% und im Mekonium von 5% auf 0% gesenkt werden. Die hohe Morbidität bei den Fleischrassen beeinträchtigt jedoch solche Programme erheblich. Auf Grund der hohen Kosten und des hohen Aufwandes sind solche Programme nur für Elitezuchtbetriebe praktikabel (Payne et al. 1997; Payne 1998a). Dieses Programm ist die Modifikation eines Versuchs, in dem Payne und Howes (1991) den Erfolg durch gesenkte Ag-Ausscheidung zeigten.

Witter (1997) ist der Meinung, dass zu einem erfolgreichen Eliminationsprogramm nicht nur die Hennen aus dem Stall genommen werden müssen, sondern dass zusätzlich noch eine Möglichkeit gefunden werden muss, um die horizontale Ausbreitung des Virus einzudämmen. Nur so sei ein Tilgungsprogramm erfolgreich.

Die Schwierigkeiten der unterschiedlichen Testverfahren und dass in ärmeren Regionen der Einsatz von PCR-Tests nicht üblich und der Einsatz von günstigeren Testverfahren nicht hinreichend genau ist wird beschrieben. Eine 10%ige falsch positive Aussage sei bei den billigeren serologischen Testverfahren zu bedenken (Payne et al. 1993b; Owen 2000).

2.9 Klinik und Verluste

Versuche, bei denen in Eintagsküken der Linie 21 neuere Isolate von HPRS-103 inokuliert wurden, zeigten, dass der erste klinische Fall nach 8 Wochen auftrat und sich im Mittel nach 18 Wochen manifestierte (Payne 1998a).

Das Auftreten der Tumoren wurde bei vier (Fadly und Smith 1999; Witter 1997) bis fünf Wochen alten Hühnern beobachtet (Payne et al. 1992).

ALV-J induziert von allen Onconaviren am häufigsten Tumoren in der Broilerindustrie. Dieser Virusstamm ist verantwortlich für viele Produktionsverluste (Crittenden 1987; Crittenden et al. 1987; Payne und Fadly 1997).

Eine Verbreitung des Virus von bis zu 87% in den USA wird durch Fadly und Smith (1999) beschrieben. In Deutschland liegen bisher Angaben von Weikel und Mitarbeitern sowie Reetz und Mitarbeitern vor. Diese geben jedoch keine genauen Angaben über Verlusten oder Verbreitung des Virus (Weikel et al. 2000; Weikel et al. 2001; Reetz 2002).

Reproduktionsverluste und erhöhte Mortalität durch ALV-J infizierte Hühner zeigen Fadly und Okazaki (1982) in ihren Studien über Hühner aus kommerziellen Zuchtbetrieben an, bei denen zum ersten Mal Hühner verglichen wurden, welche kongenital oder durch einen Kontakt infiziert waren.

Eine reduzierte Eiproduktion bei subklinisch infizierten Tieren weisen Gavora et al. (1980) und Payne (1998a) nach.

Stedman und Brown (1999) zeigen, dass Verluste durch vermindertes Gewicht bei embryonal infizierten Hühnern vorkommen. In der Studie wurde gezeigt, dass die Eier keinerlei Gewichtsverminderung aufwiesen. Die adulten Hühner erreichten jedoch nur 63,8% bis 68,4% des Gewichtes nicht infizierter Hühner. Die Haltung und Fütterung der Hühner war gleich. Vier der 40 untersuchten, positiv getesteten Tiere wiesen Tumoren auf. Die restlichen Broiler blieben, bis auf das unterdrückte Wachstum, unauffällig.

Auch Weikel et al. (2001) beschreiben bei infizierten Masthühnern eine verminderte tägliche Zunahme. Die Ausbildung von Tumoren wurde eher selten beobachtet. Dieser Arbeit ist ebenfalls eine verminderte Legeleistung und eine reduzierte Fruchtbarkeit der infizierten Elterntiere zu entnehmen. Neoplasien treten nach Meinung der Autoren erst nach Erreichen der Legereife und meistens erst nach der 40ten Lebenswoche auf. Drén et al. (2000) beschreiben die verminderte Legeleistung der von ihnen untersuchten Tiere mit < 23%.

Weitere Schäden durch ALV-J werden von Payne (1998b) beschrieben. Er zählt verspätete Geschlechtsreife, unspezifische Todesfälle und unspezifische Gewichtsverluste auf.

Die Mortalität der erkrankten Tiere hängt von den Umwelteinflüssen ab. Payne führt die landwirtschaftlichen Methoden, die Stärke der Erkrankung, das Alter der betroffenen Tiere, den Impfstatus und Begleitinfektionen, welche das Immunsystem der Tiere schwächen, an

(Payne 1998a). Spackmann et al. (2000) geben eine Mortalität von 7,8% bei infizierten Tieren an.

ALV-J ist nicht humanpathogen. Es kann sich in Säugetierzellen nicht vermehren und transformiert diese nicht (Zavala 2000).

2.10 Pathologisch-anatomische Befunde bei Infektionen mit ALV-J

Eine Vergrößerung der Leber, tumoröse Wucherungen am gesamten Skelett, hauptsächlich am Sternum, an den Wirbeln und Rippen sowie am Symsacrum, Tumoren in der Milz, in den Nieren, im Thymus und in den Gonaden werden von Payne (1988a) aufgeführt. Er fand diese Veränderungen an Hühnern, welche an ML erkrankt waren. Diese Tiere entstammten Feldversuchen und Versuchen, in denen Hühnern experimentell infiziert wurden. Weibliche und männliche Tiere waren gleichermaßen betroffen. Renale Tumoren treten häufig im Zusammenhang mit einer ALV-J Infektion auf. Auch Wang und Yuan (2000) stellten Tumoren bei mit ALV-J infizierten Hühnern in der Leber, der Milz, den Nieren, dem Sternum, den Rippen, den Wirbeln und dem Symsacrum fest. Weikel et al. (2001) fand Neoplasien an der Pleuraseite des Sternums, in der Pectoralmuskulatur sowie an den Ovarien und Hoden. Aly (2000) bestätigt diese Aussagen und berichtet von Tumoren in der Leber, der Milz, den Nieren, den Ovarien, den Rippen und dem Sternum. Nach Massi et al. (2000) stellen sich die Lebern infizierter Hühner vergrößert, blass und verhärtet dar. Die Farbe wirkt gelblich-bräunlich. Die Autoren geben zu bedenken, dass ähnliche Beschreibungen der Leber bei der Cholangiohepatitis zu erwarten sind.

Zavala (2000) charakterisiert die Myelozytome, welche durch eine ALV-J-Infektion hervorgerufen werden, als leicht zerfallende, gelbbraune Masse von unterschiedlicher Größe. Diese werden am Schädel, in der Mucosa der Trachea und um die Rippen herum gefunden.

Drén et al. (2000) definiert die Knötchen, welche sie in den Lebern und den Milzen infizierter Tiere fanden, als speckig glänzende Knötchen, die teilweise von einem dunklen Rand umgeben waren.

Nakamura et al. (2000) halten Knötchen und Vorwölbungen am Sternum, den Rippen, den Wirbeln und am Symsacrum für die auffälligsten Befunde bei der myeloischen Leukose. Untersucht wurden adulte Hühner. Diese wiesen zudem gelblich-weiße Knötchen auf der Oberfläche des Larynx und der Trachea auf. Diese Beschreibung deckt sich mit der von Payne (1998), welcher die Wucherungen am Knochen als solide Masse von Myelozyten charakterisiert.

Arshad et al. (1997) weisen in ihrer Arbeit auf eine Milzvergrößerung von über 4 cm mit weißlichen, 5 mm großen Tumoren bei mit ALV-J infizierten Tieren hin.

Das Knochenmark infizierter Tiere ist verändert. Nakamura et al. (2000) empfanden es bei ihren Untersuchungen als „nicht rot“ und gefüllt mit weißen Massen. Die Leber ist mäßig vergrößert und mit gelblich-weißen Knötchen durchsetzt. Die Milz wurde ebenso als mäßig vergrößert eingestuft. Die beschriebenen Knötchen wurden noch auf den Nieren und dem Darm gefunden. Die Ovarien und die Eileiter waren atrophiert. Makroskopisch stellt sich das Knochenmark nach Drén et al. (2000) mit gelblich-gräulichen Einlagerungen dar.

Payne (1988) hält die Vergrößerung der Leber, die er bei 88% der untersuchten Tiere fand, als das auffälligste Merkmal bei der ML. Die Knötchen auf den Knochen und den anderen Organen, welche Nakamura (2000) beschreibt, werden von Payne (1988) ebenfalls aufgezeigt. Zusätzlich beschreibt Payne noch Tumoren im Thymus und in den Gonaden.

Bei ML kommen Knötchen und Wucherungen auf der Oberfläche vom Sternum, den Rippen, den Wirbeln und am Synsacrum vor. Das Knochenmark aller Knochen ist blass. Die Leber ist geschwollen (Nakamura et al. 2000).

Das Gewicht der infizierten Tiere liegt nur bei ca. 64 bis 68% des Durchschnittsgewichtes von nichtinfizierten Tieren (Stedman und Brown 1999).

Weikel et al. (2000, 2001) untersuchten Masttiere und zeigten, dass bei den infizierten Tieren nur ein reduziertes Gewicht ohne sonstige makroskopische Veränderungen auftreten kann. Das Gewicht der infizierten Tiere lag bei nur einem Drittel der nichtinfizierten Tiere.

2.11 Pathologisch-histologische Befunde

Lichtmikroskopisch sind Veränderungen hauptsächlich durch Proliferationen der Myelozyten und -blasten im Knochenmark, in der Leber, in der Milz, im Thymus, in den Gonaden, in den Nieren sowie im Herzen erkennbar. Es kommt zu Myelozytomen am Skelett (v. a. inneres Brustbein, Rippen und Wirbelsäule) sowie zu einer Lebervergrößerung auf Grund multifokaler Anhäufungen unreifer Myelozyten v. a. im periportalen Gewebe (Nakamura et al. 2000). Dem schließen sich Weikel et al. (2000, 2001) an. Auch Drén et al. (2000) stellen die Gewebezubildungen als charakteristische myelozytomatöse Veränderungen dar. Vor allem am Sternum, am Becken, an den Rippen, den Wirbeln und am Synsacrum fielen den Autoren derartige Zubildungen auf. Histologisch wurden Myelozyten- und überwiegend Myeloblastenproliferationen nachgewiesen.

Tumoren in den anderen Organen zeigen histologisch eine mehr diffuse Verbreitung der Myelozyten (Graf und Beug 1978; Payne 1998a; Payne 1998b; Payne 2000b).

Payne (2000b) berichtet über das Vorkommen von unterschiedlichen Tumortypen in ein und derselben Hühnergruppe, welche mit ALV-J infiziert war und das Vorkommen von bis zu vier verschiedenen Tumoren in einem Huhn. Diese Tumortypen sind: Myeloische Leukose, histiozytäre Sarkome, Erythroblastose, Keimzelltumoren, Sternzelltumoren, Fibrosarkome, Hämangiome und Hämangiosarkome, Lymphome, Nierenadenome und

Nierenkarzinome, Mesotheliome, Myxosarkome, Ovarialkarzinome sowie Plasmazellenleukämie. Auch Nakamura et al. (2000) und Wunderwald et al. (2001) fanden unterschiedliche Tumorarten (Fibrosarkome, histiozytäre Sarkome, Adenokarzinome, Leiomyome) bei Tieren, welche an ML erkrankten. Drén et al. (2000) zeigt Rhabdomyosarkome und Fibrosarkome sowie Lymphatische und Erythroische Leukose assoziiert mit ML auf.

Fadly (2000) stellt krankhafte Veränderungen an infizierten Organen wie Leber, Milz, Niere und Sternum fest. Diese Organe weisen mikroskopisch unreife Myelozyten mit eosinophilen, zytoplasmatischen Granula auf. Auch Weikel et al. (2001) wiesen unreife heterophile Granulozyten in Niere, Herz und Tonsilla caecalis nach. In der Arbeit von Wang und Yuan (2000) werden die Zellen in den Tumoren als unreife Myelozyten mit charakteristischen eosinophilen Granula beschrieben. Dem schließt sich Aly (2000) an.

Weikel et al. (2001) zeigen auf, dass die Tumoren im histologischen Schnitt aus Myeloblasten und einzelnen heterophilen Granulozyten bestehen. Derartige Tumoren sind eher schlecht vom umgebenden Gewebe abzugrenzen. Lebertumoren sind hingegen eher knötchenförmig. Infiltrationen des Lebergewebes mit derartigen Zellen treten in der Leber perivaskulär auf und vermitteln einen entzündlichen Eindruck (Weikel et al. 2000). Massi et al. (2000) berichten von vermehrten Fibrineinlagerungen in infizierten Lebern und diffusen Infiltraten hauptsächlich im periportalen Bereich.

Der histologische Nachweis von unreifen Myelozyten in Geweben von geschlüpften Tieren ist nach Payne et al. (1991) pathognomonisch für myeloische Leukose. Diese Zellen werden von den Autoren als unreife, granuliert Myelozyten beschrieben, welche vor allem im periportalen Gewebe der Leber vorkommen (Payne 1998).

Seltener werden in Kombination mit ML renale Tumoren gefunden. Bei diesen handelt es sich um gut differenzierte Adenome oder Zystadenome, welche einzeln auftreten und teilweise von ML begleitet werden (Graf und Beug 1978; Payne 1998a; Payne 1998b; Payne 2000b). Wunderwald et al. (2001) zählen weiterhin noch Myxosarkome, Hämangiome und Spindelzelltumoren assoziiert mit ML auf.

Entzündliche Erscheinungen, welche vor allem in der Leber von natürlich und experimentell infizierten Tieren gefunden werden, werden als „Lymphoblastische Anpassungsreaktionen“ bezeichnet (Venugopal et al. 2000a) und sind Reaktionen der horizontalen Infektion und der Immunantwort (Payne 2000b).

Eine Myelozytenproliferation im Periost vom Sternum, den Rippen, den Wirbeln und des Synsacrums führt Nakamura (2000) an. Zuerst lassen sich diese Zellwucherungen im Knochenmark der Epiphysen nachweisen. Eine Wanderung der veränderten Zellen durch die Haver`schen und Volkmann`schen Kanäle bis zum Periost wird vom Autor beschrieben. Durch diese Proliferation wird die Hämatopoese seiner Meinung nach unterdrückt. Nakamura

(2000) fand sowohl eine Atrophie des Knochenmarks als auch eine Hypertrophie des Knochengewebes. Auch wurden Myeloproliferationen in den ossifizierten Knorpelringen der Trachea und Larynx und der Dura mata des Rückenmarks bei seinen Untersuchungen sichtbar. Die Tumorzellen zeichnen sich durch viele runde, zytoplasmatische Granula mit vielen Mitosen aus. Myelozyten wurden als Ursprungszellen diagnostiziert. Wunderwald et al. (2001) untersuchten jeweils einen Tibiotarsus von mit ALV-J infizierten Tieren und beschrieben massive Infiltrationen der befallenen Knochen von eosinophil granulierten Zellen im Markraum. Bei einigen Knochen erkannten die Autoren, dass die Kompakta von den Infiltrationen durchbrochen worden war.

Weikel et al. (2001) charakterisieren das Knochenmark infizierter Elterntiere als zellreich. Die Autoren geben zu bedenken, dass das auf jeden Fall zellreiche Knochenmark juveniler Tiere im Falle einer Infektion fast ausschließlich aus Myeloblasten besteht. Die Markräume sind mit derartigen Zellen gefüllt.

Zavala (2000) deklariert die myeloischen Zellen des Knochenmarkes als Zielzellen von ALV-J. Die durch ALV-J hervorgerufenen Myelozytome werden hauptsächlich in der Leber gefunden, können aber auch in anderen Organen histologisch nachgewiesen werden.

Experimentell konnten Venugopal et al. (2000) nachweisen, dass Puten mit dem ALV-J-Stamm 966 infiziert werden können, wenn dieser Stamm intraperitoneal in Eintagsküken inokuliert wird. Die Veränderungen der 4 Wochen alten Puten sind ähnlich denen der Hühner. Die Autoren wiesen multiple, diskrete Knötchen auf der Leber sowie in einigen Fällen eine Leberschwellung nach. Die Nieren und die Milz waren ebenfalls mit weißlichen Wucherungen befallen. Am Skelett wurden keine Tumoren gefunden. Histologisch wurden Myelozyten vor allem im Lebergewebe und in den Gefäßen der Leber nachgewiesen. Im Knochenmark konnten sie ebenfalls histologisch nachgewiesen werden.

Infiltrationen von Myeloblasten im Drüsenmagen beschreiben Weikel et al. (2001).

2.12 Elektronenmikroskopische Befunde

Die Retroviren sind behüllte, 80-100nm große, dreischichtige Viren. Der im Inneren gelegene Genom-Nukleoprotein-Komplex beinhaltet ca. 30 Moleküle der Reversen Transkriptase und ist helikal symmetrisch. Ein ikosaedrisches Kapsid mit einer ungefähren Größe von 60nm umhüllt diesen Komplex. Auf der Oberfläche befinden sich Glykoproteine, die als Spikes sichtbar sind. Die äußere Hülle entsteht durch den Budding-Prozess (Murphy et al. 1999).

Analog dazu ist der von Payne et al. (1991) charakterisierte Prototyp HPRS-103 als typisches Typ C Retrovirus mit einer mittleren Größe von 107nm (80-130nm) einzustufen. Die Replikation dieses Virus erfolgt über einen Budding-Prozess.

Ultrastrukturell stellen sich infizierte Myeloblasten mit einem großen, blastösen, runden Kern und mit großen, elektronendichten Granula im Zytoplasma dar. Typ C Partikel, welche in den

Zellen zu finden sind, werden als runde Partikel mit einer Größe von um die 80nm beschrieben. Viruspartikel werden nur selten in Vesikeln des Zytoplasmas von Tumorzellen gefunden (Nakamura et al. 2000).

Venugopal (1999) beschreibt die Virusgröße mit ca. 100nm. Das innenliegende Core ist elektronendicht, und es wird von einer Hülle umgeben.

Arshad et al. (1997) fanden Viruspartikel, welche in einem mutmaßlichen frühen histiozytären Sarkom aufzufinden waren. Dieses Sarkom war assoziiert mit ML. Die Viruspartikel waren scheinbar mit der Zellmembran verbunden. In den Zellen der Makrophagen und Dendritischen-Zellen lagen elektronendichte Granula, in deren Umgebung Viruspartikel zu finden waren.

2.13 Diagnostische Verfahren zur Feststellung einer ALV-J-Infektion

Die Diagnose von ALV-J ist auf Grund mehrerer Faktoren schwierig. So erschweren die durch die hohe Mutationsrate bedingte genetische Variabilität und die schnelle Ausbreitung die Etablierung von Diagnosemethoden. Vor allem die Variabilität der Gene bedingt, dass PCR-Primer neu modelliert werden müssen (Fadly 2000).

Payne postuliert, dass das Vorkommen von ML in einem Masthähnchenbestand als eindeutiger Beweis für eine Infektion mit dem Subtyp J angesehen werden kann. Bestätigungen sind jedoch notwendig und müssen anhand von konventionellen Diagnoseverfahren durchgeführt werden (Payne 1998a). Außer den bekannten Virusdiagnoseverfahren (Virusneutralisation (VN), Zellkultur auf Hühnerembryofibroblasten (CEF) mit anschließendem ELISA, welcher gp27 identifiziert), die mit Probenmaterial aus der Kloake, dem Serum, dem Eiklar, den Tumoren und aus vaginalen Abstrichen durchführbar sind, wurden weitere Testverfahren zur Diagnose von ALV-J Infektionen entwickelt.

ELISA

Venugopal et al. (1997) erarbeiteten ein Testverfahren, in welchem ein gs-Ag des *env* Gens (gp85) detektiert wird. Dabei werden Ak im Serum durch Neutralisation ermittelt. Ein kommerziell erhältliches Testkit wird von der Firma IDEXX (Flock Check[®]) angeboten. In der Produktbeschreibung wird darauf hingewiesen, dass das Testkit vor der 12-14ten LW nicht aussagekräftig ist, und es wird empfohlen, diesen erst nach der 14ten LW anzuwenden.

Dieser Test hat den Vorteil, dass er kostengünstig ist und schnell zu Ergebnissen führt. Er kann an Eiweiß-, Eileiter-, Kloakenabstrichen oder mit dem Mekonium durchgeführt werden.

Ein großer Nachteil dieses Testes ist es, dass gp85 nicht nur von ALV-J infizierten Tieren exprimiert wird, sondern 10% der positiven Ergebnisse auf Grund der endogenen aviären Viren zu erwarten sind. Diese EAV sind apathogen, zeigen aber positive Ergebnisse bei Untersuchungen mit dem Testkit. In Versuchen wurden EAV bei Legehühnern sowie Masttieren und spezifisch-pathogen-freien (S.P.F.) Hühnern gefunden, welche zur Bildung solcher Ag

führen (Payne et al. 1993b; Owen 2000). Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass virämische Tiere keine Ak im Serum aufweisen (Payne 2000b).

Somit sind falsch positive und falsch negative Ergebnisse möglich.

Ein neues Testverfahren, in welchem genetisch veränderte Hühnerzelllinien (DF-1 und DF-1\J) mit Probenmaterial inokuliert werden, ist von Hunt et al. (1999) entwickelt worden. Der p27 ELISA reagiert auf Proben, welche mit der DF-1 inokuliert wurden, positiv, wenn eine Infektion mit ALV-J vorliegt und negativ, wenn mit DF-1\J bebrütet wurde. Proben, die mit ALV-J und anderen Subgruppen infiziert sind, reagieren bei beiden Zelllinien positiv.

Polymerase Kettenreaktion

Die polymerase chain reaction (PCR) ist ein Testverfahren, in dem mittels zweier Primer das *env* Gen von ALV-J detektiert wird (Smith et al. 1998b).

1998 wurde der erste PCR-Test für ALV-J entwickelt. Die Primer erlaubten eine Detektion der E-Elemente und von Teilen des 3' Endes der LTR-Region (U5) des proviralen HPRS-103. 26 mit Hilfe der Virus-Isolation positiv getestete Tiere wurden mit dieser PCR untersucht. 23 Tiere zeigten positive Ergebnisse (Smith et al. 1998a).

Smith et al. (1998b) entwickelten einen PCR-Test, um weitere Isolate von ALV-J zu diagnostizieren. In diesem Test beginnt der Plusprimer (H5) die Hybridisierung und Verlängerung an dem *pol* Gen, die Minusprimer (H5 und H7) setzen an der gp85 Sequenz im *env* Gen des Virusgenoms an. Das Basenprodukt enthält 764 Basenpaare und zeigt keine Aminosäureunterschiede zu den entsprechenden Teilstücken von HPRS 100-104. In Untersuchungen, in welchen der Minusprimer H2 eingesetzt wurde, wurden HPRS-103-ähnliche, und bei Einsatz des Primers H7 neuere Isolate von ALV-J amplifiziert. Die neueren Isolate wiesen ausgedehnte antigenetische Besonderheiten und Sequenzvariationen auf.

In Erweiterung des Testverfahrens wurde die Reverse Transkriptase amplifiziert, und somit konnten sowohl die virale RNA als auch die DNA diagnostiziert werden (Payne et al. 1991; Benson et al. 1998a; Smith et al. 1998a; Smith et al. 1998b; Smith et al. 1999).

Ein weiteres Primerset detektiert das einheitliche E-Element von ALV-J (Smith et al. 1998a).

Kombinierte Verfahren

Fadly (2000) ist der Ansicht, dass eine sichere Diagnose nur durch eine Kombination aus verschiedenen Verfahren möglich ist. Diese ist aus den folgenden vier Teiluntersuchungen zu realisieren:

1. Positive Reaktionen in Virusneutralisationstests mit spezifischen ALV-J Antikörpern
2. Positive Reaktionen in einer PCR mit J-spezifischen Primern
3. Virusanzucht in Subtyp A und E resistenten CEF (C/AE)
4. Unvermögen der Virusvermehrung in Stamm J resistenten Zelllinien (DF-1\J CEF).