

3 Material und Methodik

3.1 Tiermaterial

Die Untersuchungen erfolgten an insgesamt 74 Masthühnern der Linie Cobb und Ross. 64 Tiere (Gruppe mit Leberveränderungen, im Folgenden **Gruppe LV** genannt) wurden auf Grund von makroskopisch veränderten Lebern während der Geflügelfleischkontrolle ausgewählt. Es handelte sich um 30 männliche und 34 weibliche Tiere.

10 unbeanstandete Tiere wurden als Gruppe ohne Leberveränderungen (im Folgenden als **Gruppe OLV** bezeichnet) mituntersucht. Hierbei wurden die Tiere zufällig vom Schlachtband genommen. Sieben männliche und drei weibliche Tiere kamen zur Untersuchung.

Der Schlachthof schlachtete an den gewählten Tagen Tiere aus 27 verschiedenen Ställen (insgesamt neun verschiedene Herkunftsbetriebe). Eine genaue Zuordnung der Rassen zu den Probennummern sowie deren Herkunft war angesichts des laufenden Schlachtprozesses nicht möglich.

Das Alter der Tiere lag zwischen 33 und 35 Tagen.

3.2 Massenerfassung und pathologisch-anatomische Untersuchung

Der Schlachtkörper sowie die Leber, die Milz, die Nieren, das Herz, der Drüsenmagen, der Muskelmagen, das Darmkonvolut und die Bursa Fabricii wurden gewogen und makroskopisch beurteilt. Ein vorbereitetes Untersuchungsprotokoll wurde hierbei verwendet. Dieses beinhaltete die Tiernummer, das Geschlecht, das Gewicht des Schlachtkörpers und der Organe sowie die pathologischen Veränderungen der Organe. Die gefundenen Leberveränderungen wurden in fünf Typen eingeteilt und quantitativ bewertet. Ein zusätzlicher Typ, welcher einen qualitativen Unterschied zu den anderen darstellte, wurde als „Typ VI“ mit in die Bewertung aufgenommen. Die Einteilung der Typen und eine Beschreibung der makroskopischen Veränderungen werden unter Punkt 4.2.1.1 „Leberveränderungen“ noch eingehend dargestellt.

Die Gruppe OLV wurde zum Vergleich mituntersucht. Diese Tiere wiesen keine makroskopischen Veränderungen auf.

3.3 Histologische Untersuchung

Von folgenden Organen wurden Proben für die histologischen Beurteilungen entnommen: Leber, Nieren, Nebennieren, Herz, Knochenmark, Trachea, Lunge, Nervus ischiadicus, Thymus, Milz, Bursa Fabricii, Kropf, Drüsenmagen, Darm (bestehend aus: Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon, Caecum). Die Verteilung wird in Tabelle 2 wiedergegeben.

Diese Organproben wurden auf dem Schlachthof in 10%igem Formalin fixiert. Nach mindestens 24 stündiger Fixation in Formalin wurden die Proben in dem Entwässerungs- und Fixationsautomat „Hypercenter XP®“ der Firma Shandon entwässert und in flüssiges Paraffin eingebracht. Die so behandelten Proben wurden in Paraffinblöckchen gegossen und gekühlt. Im Folgenden wurden sie mit einem Mikrotom auf eine Dicke von 3 µm geschnitten und für die histologische Untersuchung gefärbt.

Tabelle 2: Anzahl der entnommenen Organproben aus den jeweiligen Untersuchungsgruppen

Organ	Anzahl der Tiere aus der Gruppe LV	Anzahl der Tiere aus der Gruppe OLV
Leber	64	10
Nieren	63	10
Nebennieren	58	10
Herz	64	10
Knochenmark	21	10
Trachea	58	10
Lunge	64	10
Nervus ischiadicus	64	10
Thymus	62	10
Milz	63	10
Bursa Fabricii	61	10
Kropf	51	10
Drüsenmagen	62	10
Darm (Duodenum, Jejunum, Ileum, Kolon und Caecum)	64	10

3.3.1 Färbemethoden:

Hämalaun-Eosin (HE) Färbung:

1. Entparaffinieren: (jeweils fünf Minuten) vier Mal Xylol (Brauer, Hilman GmbH & Co; 1.08681.2504), zwei Mal absoluter Alkohol, ein Mal 96%iger, ein Mal 80%iger, ein Mal 70%iger Alkohol.
2. Entparaffinierte Schnitte in Hämatoxylin färben 5 Minuten.
3. Spülen mit Wasser.
4. Differenzieren in 1%iger alkoholischer Salzsäure 3 Sekunden.
5. Wässern bis zur intensiven Blaufärbung; mindestens 30 Minuten.
6. Gegenfärben in 1%iger alkoholischer Eosinlösung 3 Minuten.
7. Entwässern und Eindecken.

Giemsa-Färbung nach Lennert:

1. Entparaffinieren.
2. 2 Stunden in 1:50 verdünnter Giemsa-Lösung färben.
3. In mit Essigsäure (ein Tropfen auf 100 ml) versetztes Aqua dest. 30-40 min differenzieren.
4. In 96%igem Alkohol schwenken, bis keine Farbwolken mehr abgehen.
5. 1 min in Hämalaunlösung nach Meyer (Brauer, Hilman GmbH & Co; 1.09249.0506) tauchen.
6. In Aqua dest. abspülen und dort 10 min nachbläuen.
7. Zwei Mal in Isopropanylalkohol und drei Mal in Xylol à 30 sec schwenken.
8. In Kanadabalsam (Brauer, Hilman GmbH & Co; 1.01693.0100) einbetten.

Azanfärbung

1. Schnitte entparaffinieren und in Wasser bringen.
2. Einbringen der Objektträger (OT) in die vorgewärmte Azokarminlösung im Wärmeschrank bei 56°C (15 Minuten). Azokarmin-Färbelösung: 1g Azokarmin G in 1000 ml Aqua dest. aufschwemmen, kurz aufkochen und nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur filtrieren. Zuletzt wird der Lösung 10 ml Eisessig zugesetzt.
3. Abspülen der Schnitte in Aqua dest.
4. Kurzes Differenzieren in Anilin-Alkohol (1 ml Anilinöl auf 1000 ml 96%igen Alkohol), bis nur noch die Zellkerne gefärbt sind.
5. 30 bis 60 sec auswaschen des Anilins in Essigsäure-Alkohol (10 ml Eisessig auf 1000 ml 96%igen Alkohol). Sollte das Gewebe noch zu stark gefärbt sein, kommt das Präparat nochmals in Anilin-Alkohol.

6. Ein bis drei Stunden in 5%iger wässriger Phosphorwolframsäure beizen (20 g auf 400 ml Aqua dest.).
7. Es folgt kurzes Abspülen in Aqua dest.
8. Ein bis drei Stunden in Anilinblau-Orange-G-Essigsäure färben (2,5 g Anilinblau wasserlöslich und 10 g Orange G in 500 ml Aqua dest. lösen, 40 ml Eisessig zusetzen, aufkochen und nach dem Erkalten filtrieren. Zur Färbung verdünnt man diese Stammlösung 1:1 bis 1:3 mit Aqua dest.).
9. Kurz in Aqua dest. abwaschen, in 96%igem Alkohol differenzieren, folgend in Ethanol und Xylol tauchen und anschließend mit Kanadabalsam (Brauer, Hilman GmbH & Co; 1.01693.0100) eindecken.

Warthin–Starry-Färbung

(Versilberung nach Warthin und Starry (Steininger 1989))

1. Entparaffinieren der Schnitte.
2. Imprägnieren der Präparate in einer, auf etwa 45°C erwärmten, 1%igen Silbernitratlösung (1g AgNO₃ in 100 ml Aqua bidest.) für 60 Minuten.
3. Vorbereiten der Entwicklerlösung: 2%ige Silbernitratlösung (2 g AgNO₃ in 100 ml Aqua bidest.), 5%ige Gelatine (5 g pulverisierte Gelatine in 100 ml Aqua bidest.), 0,15%ige Hydrochinonlösung (0,15 g Hydrochinon in 100 ml Aqua bidest.).
4. Die Einzelsubstanzen der Entwicklerlösung werden auf 45°C erwärmt. Vermischen der Lösungen erst kurz vor Gebrauch.
5. Beschichten der Präparate mit der Entwicklerlösung und Auflage der Schnitte auf die OT. Die Präparate werden dann 1-2 Minuten von gelb nach braun gefärbt.
6. Abbrechen der Entwicklung bei genügender Farbintensität (=hellbraun). Spülen der Präparate im 60°C warmen Wasser.
7. Dehydrieren in 96%igem und absolutem Alkohol. Eindecken der OT über Xylol.
8. Mit Kanadabalsam eindecken.

Das verwendete Aqua bidest. muss auf pH 4 angesäuert werden (z.B. mit 0,4%iger Zitronensäure).

3.3.2 Auswertung der Schnittpräparate

Die histologische Untersuchung erfolgte an den Lichtmikroskopen Zeiss Axiolab und Olympus BX50, welches mit einer Kamera (Olympus Color view[®] 12) ausgestattet war. Die Darstellung der Schnittpräparate auf einem Monitor erfolgte durch die Software analySIS[®] 3.1 von Olympus.

Die Schnitte wurden semiquantitativ ausgewertet. Hierzu wurden vorgefertigte Listen zu jedem Organ verwendet, welche eine graduelle Einteilung einer Akkumulation unreifer

heterophiler Granulozyten semiquantitativ zuließen. Diese Einteilung in unterschiedliche Grade zwischen 0 bis 3 Kreuzen richtete sich nach dem in Tabelle 3 dargestellten Schema.

Tabelle 3: Schema der Einteilung von Akkumulationen unreifer heterophiler Granulozyten im Lebergewebe

Grad	Histologische Beurteilung
+++	Akkumulationen unreifer heterophiler Granulozyten treten im histologischen Bild mehrfach auf, sind sofort auffindbar und in jedem Ausschnitt darstellbar.
++	Akkumulationen unreifer heterophiler Granulozyten treten im histologischen Bild vereinzelt auf, sind jedoch durch Durchmustern des Schnittes sofort auffindbar.
+	Akkumulationen unreifer heterophiler Granulozyten sind im histologischen Bild sporadisch vorhanden und nach längerem Durchmustern des Schnittpräparates auffindbar.
-	Akkumulationen unreifer heterophiler Granulozyten sind im histologischen Bild auch nach längerem Durchmustern des Schnittpräparates nicht auffindbar.

Weiterhin standen Spalten für Entzündungserscheinungen, Nekrosen und degenerative Veränderungen der einzelnen Zellen oder für andere auffallende pathologische Veränderungen zur Verfügung.

3.4 Transmissionselektronenmikroskopie

Auf dem Schlachthof wurden von 15 Tieren Proben von der Leber und des Knochenmarks in 2,5%igem Glutardialdehyd fixiert, um am folgenden Tag weiter für die **Dünnschnitttechnik** bearbeitet werden zu können.

Für die **Negativkontrastierung** wurden von folgenden Organen native Präparate entnommen: Leber, Knochenmark und Darminhalt. Von 74 Tieren wurden Proben dieser Präparate untersucht.

3.4.1 Dünnschnitttechnik

Fixation und Kontrastierung der Proben

Erster Tag

1. Die Proben werden direkt nach der Entnahme auf Photopapier gelegt und zur Fixation mit 2,5%igen Glutardialdehyd beschichtet.
2. Es werden ca. 2 X 1 mm große Stücke zurechtgeschnitten und in Reagenzgläser mit Glutardialdehyd verbracht, wo sie einen Tag zur Fixation lagern.
3. Nach dem Abgießen des Glutardialdehyds werden sie mit Hapes-Puffer (pH 7,2) (Electron Microscopy Science; 11494) zwei Mal gespült.
4. Nach dem Spülvorgang folgt die Nachfixation und die Kontrastierung der Präparate über mindestens 1,5 h mit einer 2%igen Osmiumtetroxid-Lösung (OsO₄ in Aqua dest.).

5. Der zwei Malige Spülvorgang mit Hepes-Puffer wird so angelegt, dass die Probe insgesamt 1 h in der Lösung verbleibt.
6. Weitere Kontrastierung der Präparate mit Uranylacetat als 2%ige Lösung in Aqua dest. über 1,5 h an einem dunklem Ort.
7. Folgende Spülvorgänge schließen sich an: 1 h 25%iger Alkohol; 1 h 50%iger Alkohol; 70%iger Alkohol (hierin kann das Präparat unbeschadet lagern).

Zweiter Tag

1. Absoluten Alkohol für 1h in die Reagenzgläser (RGs) füllen.
2. RGs leeren und 1,2-Propylenoxid (C₃H₆O) für 15 min einfüllen.
3. Einlegen der Gewebe in ein Gemisch aus Epoxidharz und Propylenoxyd (Verhältnis 1:1) für 1h.
4. Reines Epoxidharz für eine Stunde in die RGs füllen.
5. Die Präparate in beschriftete Gelatinekapseln geben, welche einen Tropfen Epoxidharz enthalten.
6. Auffüllen der Kapseln mit Epoxidharz.
7. Polymerisationszeiten im Brutschrank: 1 Tag bei 30°C, 1 Tag bei 40°C und 1 Tag bei 60° C.

Anfertigung der Semidünnschnitte

Von den Präparaten werden mit dem Ultramikrotom „Super Nova“ der Firma „Reichert-Jung, Optische Werke AG“ ca. 2 µm dicke Semidünnschnitte erstellt.

In dem Ultramikrotom befinden sich selbst hergestellte Glasmesser, welche folgendermaßen mit dem „LKB Bromma 7800 Knifemaker“ angefertigt wurden: Erst werden aus einem rechteckigen Glasstreifen Quadrate gebrochen, welche dann nochmals zu Dreiecken gebrochen werden. Diese können nun in das Ultramikrotom eingespannt werden. Die entstandene Bruchstelle dient als Schnittfläche.

Die Semidünnschnitte werden nun von dem Glasmesser abgehoben und auf einen Objektträger gebracht, auf welchem ein Wassertropfen liegt. Das Präparat wird anschließend 1 h bei 100°C im Sterilisator fixiert. Nachfolgend wird das Präparat gefärbt:

Toluidinblau-Färbung

1. 0,1%ige Toluidinblaulösung (Toluidin in 2,5% Na-Carbonatlösung (pH 11) gelöst) wird auf den OT geträufelt, bis dieser mit der Lösung überschichtet ist. Die Färbezeit beträgt 30-60 Minuten.
2. Der OT wird mit Aqua dest. gespült.
3. Das Präparat wird bei Raumtemperatur getrocknet.
4. Der OT wird nun mit Entellan[®] (Merck; 7961) eingedeckt.

Nachfolgend werden die Schnittpräparate unter einem Lichtmikroskop begutachtet und beurteilt. Eine Schemazeichnung wird angefertigt, welche die Position für den folgenden Ultradünnschnitt angibt.

Anfertigung der Ultradünnschnitte

Die Gelatine kapseln werden mit einer Rasierklinge nach der Schemazeichnung feingetrichtert. Die Ultradünnschnitte werden mit dem Ultramikrotom angefertigt. Hierfür werden Diamantmesser der Firma DDK genutzt. Diese Messer enthalten eine Wanne, welche mit Aqua dest. gefüllt ist. Das beim Schneiden entstehende Schnittband rutscht auf die Oberfläche des Aqua dest. und kann von hier mit Kupfernetzen aufgefangen werden.

Nachkontrastieren der Schnitte

Der Boden einer Glas-Petrischale wird mit einem Paraffinstreifen ausgelegt. Um diesen Streifen herum werden reine Natriumhydroxid-Plättchen (Merck; 1.06462.1000) gelegt. Auf den Paraffinstreifen werden nun ein Tropfen alkalisches Bleicitrat (10 ml Aqua dest. + 0,1 ml 0,5 N NaOH + 40 mg Bleicitrat (Fluka AG; 225949-1281; Blei (II)-citrat-Trihydrat)) und fünf Tropfen 0,02 N NaOH geträufelt. Der Deckel der Petrischale wird für eine halbe Minute geschlossen. Im Anschluss wird das Schnittpräparat für ca. 20 sec. mit einer Pinzette auf den Bleicitrat tropfen gelegt. Das Kupfernetz wird wieder mit der Pinzette gegriffen und auf alle NaOH-Tropfen „gedippt“. Zwischen den einzelnen Schritten wird die Flüssigkeit mit Filterpapier aufgesogen. Im Anschluss daran wird das Netz in zwei Behältnissen mit Aqua dest. geschwenkt. Nach dem Trocknen auf Filterpapier können die Präparate im Elektronenmikroskop begutachtet werden.

3.4.2 Negativkontrasttechnik

1. Material mörsern.
2. Material mit Aqua dest. in ein RG geben.
3. 1 h sedimentieren lassen.
4. 50 µl vom Überstand auf Parafilm pipettieren.
5. Auf diesen Tropfen zwei Netze mit der beschichteten Seite auf die Flüssigkeit legen und dort 7 min liegen lassen (Netze von Plano W. Plannet GmbH, D-35578 Wetzlar; Artikel G 2300 C; befilmt mit Pioloform (0,8% in Chloroform gelöst); diese Netze dann noch mit Kohle bestäuben).
6. Ein Tropfen Glutardialdehyd auf Parafilm pipettieren und hierauf die Netze 1 min legen (Fixation).
7. Ein Tropfen Aqua bidest. auf Parafilm pipettieren und die Netze 1 min darauf legen (Spülung).
8. Ein Tropfen Uranylacetatlösung (gesättigte Lösung: 2%ig, in Aqua dest. gelöst) auf Parafilm pipettieren und darauf die Netze 1 min legen (Kontrastierung).

9. Die Netze werden in einer Grid-Box™ (705525; Reichert-Jung) aufbewahrt.

3.4.3 Auswertung der Ultradünn- und Negativkontrastpräparate

Die Präparate wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop EM 109 der Firma Zeiss mikroskopiert. Die negativkontrastierten Präparate wurden bei 50.000facher Vergrößerung, die Ultradünnschnitte bei 7.000 bis 30.000facher Vergrößerung untersucht.

3.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Auf dem Schlachthof wurden Proben der Hühnerlebern (ca. 1g) in Eppendorf Röhrchen verbracht und gekühlt bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. So schnell wie möglich wurden diese Proben bei -80°C eingefroren und erst wieder bei Bedarf aufgetaut. Die Zeit bis zum Einfrieren variierte zwischen 6 und 8 Stunden. In der Zwischenzeit wurden die Proben in einer Kühlbox gelagert.

Als Referenzprobe (Positivkontrolle) galt ein über 20 Wochen altes Mastelternier, welches an Aviärer Myeloischer Leukose (AML) erkrankt war. Dieses Tier wies pathomorphologisch folgende Kriterien für AML auf: Lebervergrößerung, Myelozytome am inneren Brustbein, an den Rippen und an der Wirbelsäule.

3.5.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion der Proben wurde mit dem kommerziell erhältlichen „QIAGEN® DNeasy Tissue Kit“ (69504; QIAGEN®) durchgeführt. Die Lagerung der Reagenzien erfolgte bei Zimmertemperatur. Eine Ausnahme war die Proteinase K, welche bei 5-8°C gelagert werden muss. Der Ablauf richtete sich nach folgendem Schema und entspricht der Herstellerverordnung:

3.5.1.1 Anleitung für die DNA-Extraktion

1. Alle Reagenzien und das Untersuchungsmaterial müssen auf Zimmertemperatur gebracht werden.
2. 0,5 g Material werden mit einer Schere zerkleinert und in ein 15 ml Röhrchen gegeben.
3. 3,6 ml ATL-Puffer und 400 µl Proteinase K (Bestellnummer: 19133 der Firma Qiagen®) der Probe zuführen.
4. Die Probe wird 120 min in einem Mini-Hybridisierungssofen unter Schütteln bei 55°C inkubiert.
5. Anschließend jeweils zwei Eppendorf-Reaktionsgefäße für die Doppelbestimmung beschriften und je 210 µl der lysierten Probe mit 200 µl AL-Puffer einfüllen.
6. Das Untersuchungsmaterial kommt 15 sec auf den „Vortex“ (Rüttler), um die Lösung zu homogenisieren.
7. Nun folgt eine Inkubation über 10 min bei 70°C.

8. 200 µl Ethanol werden dazugeben. Es bilden sich zwei Schichten.
9. 15 sec „Vortex“ schließen sich an, um die Lösung erneut zu homogenisieren.
10. Die gesamte Lösung wird auf eine der mitgelieferten Säulen gegeben und eine Minute bei 600 g (8000 UpM) zentrifugiert.
11. Das Zentrifugat wird verworfen. Die Säule wird in ein neues Röhrchen (ebenfalls im Kit enthalten) gestellt, und es werden 500 µl AW1-Puffer dazugegeben.
12. Erneutes Zentrifugieren erfolgt bei 600 g über 1min.
13. Das Zentrifugat wird wiederum verworfen. Die Säule wird in ein neues Röhrchen gestellt, und 500 µl AW2-Puffer werden dazugeben.
14. Bei Höchstleistung 3 min zentrifugieren.
15. Das Zentrifugat wird erneut verworfen. Die Säule wird in ein neues, beschriftetes Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und es folgen 2 Elutionen (Lösen der DNA aus dem Filter).
16. Es werden zur Elution 200 µl AE-Puffer auf die Säule gegeben und bei 600 g zentrifugiert.
17. In diesem Zentrifugat befindet sich nun die DNA. Das Röhrchen wird beschriftet und für die weitere Bearbeitung bei -80°C eingefroren.
18. Die zweite Elution erfolgt analog der ersten. Die schon ein Mal eluierte Säule wird erneut mit 200 µl AE-Puffer bei 600 g zentrifugiert und das Röhrchen beschriftet und eingefroren.

3.5.2 Polymerase-Kettenreaktion

DNA-PCR

Die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) wurden modifiziert nach Smith et al. (1998) durchgeführt. Diese PCR ermöglicht es, DNA-Sequenzen der Aviären Leukoseviren Subgruppe J sowie A bis E zu amplifizieren. Als Plusprimer wurde H5 gewählt, als Minusprimer entsprechen der Subgruppe, welche gefunden werden sollte: H2 für HPRS-103, H7 für neuere Isolate von ALV-J und ADI für die Subgruppen A bis E der ALV.

Primersequenzen für die DNA-PCR:

1. H2= 5`ACTGGTGAATCCACAATATCTACG3`
2. H5= 5`GGATGAGGTGACTAAGAAAG3`
3. H7= 5`CGAACCAAAGGTAACACACG3`
4. ADI= 5`GGGAGGTGGCTGACTGTGT3`

Um die Subgruppen A bis E zu amplifizieren, wurde parallel zu der PCR von Smith et al. (1998) die Methode von Pham et al. (1999) getestet. Es wurde aber letztendlich die Methode von Smith gewählt, da hierbei eindeutiger Banden im Ergebnis zu erkennen waren.

Reaktionsansatz für die DNA-PCR:

Nachdem mehrere Polymerasen verschiedener Anbieter getestet wurden, wurde folgender Reaktionsansatz für die „touch down“ PCR mit „hot start“ genutzt (Reaktionsvolumen 25 µl):

Aqua bidest.
1 X PCR-Puffer
2,5 mM MgCl₂
0,2 mM jedes dNTP
0,25 µM Plusprimer

Cyclerbedingungen für die DNA-PCR:

Die Cyclerbedingungen lauteten wie folgt:

10 min 94°C
13 Zyklen à :
1 min 93°C Denaturierung
1 min 61°C Annealing
1 min 30 sec 72°C Extension
30 Zyklen à :
1 min 93°C Denaturierung
1 min 48°C Annealing
1 min 30 sec 72°C Extension
10 min 72°C Finalexension

Nested PCR der DNA-PCR

Die nested PCR für ALV-J wurde genutzt, um die Spezifität und Sensitivität der PCR-Systeme zu erhöhen. Folglich wurde eine weitere Amplifikation an die PCR angeschlossen. Die dafür erforderlichen Primer wurden mit Hilfe der Software „MacVector“ (Mac Vector™ 6.0; CS1217-00; Oxford Molecular) entworfen und geprüft.

Primer für die nested PCR:

Die Sequenz der Primer für die nested PCR des Subtyps J lautete wie folgt:

1. ALV-J Plusprimer: 5'TGGGAAGGTGAGCAAGAAGGAC3`
2. ALV-J Minusprimer: 5`CAAGGGAGGGTTGTATTTAGAGCC3`

Reaktionsansatz für die nested PCR:

Der sich daraus errechnete Reaktionsansatz lautete wie folgt:

14,8 µl Aqua bidest
2,5 µl Puffer
2 µl dNTP`s (je 10 mM)
1,5 µl MgCL (25 mM)
1,5 µl Plusprimer (25 mM)
1,5 µl Minusprimer (25 mM)
0,125 µl „AmpliTaq Gold™“ (5 U/µl)

Cyclerbedingungen für die Nested PCR:

Es wurden jeweils 2 µl aus der ersten PCR-Reaktion eingesetzt und im Cycler erneut amplifiziert. Die Cyclerangaben lauteten folgendermaßen:

10 min 95°C
40 Zyklen à :
30 sec 94°C Degeneration
1 min 58°C Annealing
1 min 60°C Extension
10 min 68°C Finalexension

PCR zur Amplifikation der Subgruppe E:

Die Produkte der PCR wurden stichprobenartig auf das Vorhandensein der Subgruppe E ebenfalls mit Hilfe der Methode von Pham et al. (1999) untersucht. Der Ansatz ist analog dem von Smith et al. (1998).

Primer für die Amplifikation der Subgruppe E:

1. ALV-E Plusprimer: 5`GGCTTCGCCCCCACTCAA3`
2. ALV-E Minusprimer: 5`GCACATCTCCACAGGTGTAAT3`

Cyclerbedingungen für die Amplifikation der Subgruppe E:

Die Cyclerbedingungen lauteten wie folgt:

10 min 94°C
40 Zyklen à :
30 sec 94°C Denaturierung
1 min 60°C Annealing
2 min 68°C Extension
7 min 68°C Finalexension

Nested RT-PCR

Stichprobenartig wurden die Produkte der DNA-Extraktion (DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen®, s. o.) auf das Vorhandensein von RNA getestet. Der Hersteller gibt jedoch keine Garantie auf RNase-Freiheit des Testkits, und somit ist die Produktqualität nicht gesichert. Die RT-PCR der Proben erfolgte mit dem „Qiagen® Onestep RT-PCR Kit“ (210210; QIAGEN®) mit „hot start“. Dieses Kit enthält alle benötigten Komponenten.

Primer für die nested RT-PCR:

Die Primer und das Probenvolumen (2 µl) sind gleich denen der DNA-PCR (Primer H5 und H7).

Reaktionsansatz für die nested RT-PCR:

Der Reaktionsansatz errechnete sich wie folgt:

8,5 µl Aqua bidest.
5 µl Q-Solution
5 µl Puffer
1 µl dNTP`s (= 2 mM/µl)
1 µl Plusprimer (25 pmol/µl)
1 µl Minusprimer (25 pmol/µl)
1 µl Enzyme-Mix
0,5 µl RNase Inhibitor (20U/µl)
RNA

Cyclerangaben für die nested RT-PCR:

Die Cyclerangaben lauteten folgendermaßen:

30 min 50°C
10 min 95°C
40 Zyklen à:
30 sec 94°C Degeneration
30 sec 50°C Annealing
1 min 68°C Extension
10 min 68°C Finalexension

Gelelektrophorese

Nach einer Gelelektrophorese in 1,5%igem Agarosegel (Agarose Serva; Lot 10945; Serva) wurde die Basenlänge der PCR-Produkte mittels photographischer Darstellung unter UV-Licht dargestellt. Der Ansatz lautete wie folgt:

1. 0,5 g Agarose + 25 ml TBE-Puffer (54 g Tris-Puffer + 27,5 g Borsäure + 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) + 5 l Aqua bidest.) 3 Mal aufkochen und abkühlen.
2. 10 µl Ethidiumbromid (300081; Fa. Stratagene) zugeben und das Gel in die Kammer gießen.
3. Nach Erkalten des Gels 250 ml TBE-Puffer aufschichten und den Kamm entfernen.

Anschließend wurden 1,5 µl der Stopplösung (2 Teile 40%ige Saccharoselösung + 1 Teil 0,25%ige Bromphenolblaulösung) mit 5,5 µl der Probe vermischt und in die vorgefertigten Taschen des Gels gegeben. Am Rand des Gels wurde der Marker (DNA-Längenstandard XIII; Best. Nr. 1 721 925; Firma Boehringer Mannheim) injiziert.

Cycle-Sequencing

Um die Sequenz der PCR-Produkte zu beschreiben, erfolgte das Cycle-Sequencing.

Dieses geschah wie folgt:

1. Reinigung der PCR-Produkte mit Centricon[®] YM-100 der Firma Amicon (Produktnummer 4212) entsprechend der Herstellerbeschreibung:

2 ml Aqua bidest. + 20 µl Probe
10 min im Festwinkelrotor bei 4000 UpM zentrifugieren
nach der Gebrauchsanweisung die Tubes
umstecken und erneut bei 1315 UpM für 3 Minuten zentrifugieren

2. Cycle-Sequencing mittels „BigDye™ Terminator“ (Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion; 4303152; Applied Biosystems). Es wurden dieselben Primer genutzt wie in der PCR. Hier wurde 1 µl in einer Konzentration von 3,2 mol/µl eingesetzt. Weiterhin wurden 4 µl Reaktionsmix, 10 µl Aqua bidest. und 5 µl Probe dazugegeben (Reaktionsvolumen 20 µl).

Cyclerangaben für das Cycle-Sequencing:

Der Cycler wurde folgendermaßen eingestellt:

1 min 96°C
25 Zyklen à:
10 sec 96°C
5 sec 50°C
4 min 60°C

Reinigung der Produkte

Die Reinigung der Produkte erfolgte mit „DyeEx™ Spin-Kit“ (Best. Nr.: 63104) der Firma Qiagen® nach Herstellervorschrift. Nach der Denaturierung bei 90°C über 2 Minuten wurden die Sequenzen mittels „ABIPrism™ 310, Version 3.0“ (Applied Biosystems) aufgetrennt und ausgewertet.

Auswertung und Sequenzierung

Die Software „Navigator“ (Sequence Navigator®; 902812; Applied Biosystems) und „MacVector“ werteten die Sequenzprodukte aus.

Verdünnungsreihe

Um die Sensitivität der nested DNA-PCR zu überprüfen und um zu ermitteln, um wieviel sensitiver diese Form der PCR gegenüber der in der Literatur beschriebenen Form ist, wurde eine Verdünnungsreihe mit Probenmaterial des Referenzstieres durchgeführt. Das Ausgangsprodukt (bei der DNA-PCR die erste und zweite Elution, bei der nested DNA-PCR nur die zweite Elution) wurde hierfür mit Aqua bidest. verdünnt. Für die DNA-PCR wurde das Probenmaterial bis 10^{-5} verdünnt. Für die nested DNA-PCR wurde das Probenmaterial bis 10^{-10} verdünnt.

3.6 Bakteriologische Untersuchungen

Leber-, Darm- und Nierenproben wurden mit bakteriologischen Methoden auf folgende Keime hin untersucht: *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. und coliforme Keime. Die Untersuchungsmethoden richteten sich im Wesentlichen nach der „Amtlichen Sammlung von Untersuchungsverfahren nach § 35 LMBG vom Februar 1996“ (Untersuchung von Lebensmitteln, Bestimmung von *Escherichia coli* in Fleisch und Fleischerzeugnissen; Fluoreszenzoptische Koloniezählverfahren unter Verwendung von Membranfilter-Spatelverfahren (Referenzverfahren) 06.00-36). Die Durchführung der Arbeiten erfolgte im Fachgebiet 301 (Mikrobiologie und Hygiene) und 302 (Fleisch- und Geflügelfleischhygiene) des Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV). Die Ergebnisse wurden für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

3.6.1 Nachweis von *Campylobacter* spp.

Proben der Lebern sowie Tupferproben des Blinddarmkotes von 64 Tieren (54 Tiere der Gruppe LV und 10 Tiere der Gruppe OLV) und Proben der Nieren von 26 Tieren (16 Tiere der Gruppe LV und 10 Tiere der Gruppe OLV) wurden für den qualitativen Nachweis von *Campylobacter* spp. in Preston-Anreicherung (OXOID; CM 67) verbracht und bei 42°C für 24 Stunden mikroaerophil bebrütet. Nach Ausstrich der Anreicherungen auf Preston-Agar (OXOID; 689) und mikroaerophiler Bebrütung der Selektivmedien bei 42°C für 48 Stunden wurden die *Campylobacter*-verdächtigen Kolonien isoliert und differenziert.

3.6.2 Nachweis von Salmonellen

Für den qualitativen Nachweis von Salmonellen wurden steril entnommene Leberproben sowie Tupferproben des Blinddarmkotes von 64 Tieren (54 Tiere der Gruppe LV und 10 Tiere der Gruppe OLV) in 1%iges gepuffertes Peptonwasser (SIFIN; TN 1137) verbracht und für 16 bis 20 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurden jeweils 0,1 ml der Voranreicherung in 10 ml Rappaport-Vassiliadis (RV)-Anreicherungslösung (OXOID; CM 669B) und 10 ml modifizierte Tetrathionat-Brilliantgrün-Galle (TBG)-Anreicherungsbouillon (MERCK; 1.05178) mit Zusatz von 0,04 g/l Novobiocin-Mononatriumsalzlösung (MERCK; 1.06255) überführt. Die Selektivanreicherungen wurden nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C (TBG) bzw. 42°C (RV) auf Rambach®-Agar (MERCK; 1.15999) und Xylose-Lysin-Desoxycholat (XLD)-Agar (MERCK; 1.15184) ausgestrichen. Nach der Bebrütung der Selektiv-Agarplatten (18 bis 24 Stunden bei 37°C) wurde mindestens eine verdächtige Kolonie pro Platte mit omnivalentem *Salmonella*-Antiserum (SIFIN; TR 1105) agglutiniert. Kolonien mit einer positiven Agglutinationsreaktion wurden isoliert und differenziert.

3.6.3 Nachweis von coliformen Keimen

Die Untersuchung von 63 Leberproben (53 Tiere der Gruppe LV und 10 Tiere der Gruppe OLV) auf das Vorkommen von coliformen Keimen erfolgte durch Beimpfen von zwei verschiedenen Selektiv-Agarplatten (GASSNER-Agar, MERCK; 1.13580 und Fluorocult® ECD-Agar, MERCK; 1.04038) mit 0,1 ml der nicht bebrüteten bzw. 10 µl der bebrüteten Salmonella-Voranreicherung und anschließender Differenzierung.

3.6.4 Nachweis von Pasteurellen und Pseudomonas aeruginosa

Weiterhin wurden von 47 Tieren (37 Tiere der Gruppe LV und 10 der Gruppe OLV) Leber-, Milz- und Darmproben auf Pseudomonas aeruginosa und Pasteurella haemolytica hin untersucht, wenn die Bebrütung der Blutplatten eine β -Hämolyse aufwies. Eine Speziesdifferenzierung erfolgte nicht.

3.7 Statistische Auswertung

Die gemessenen Körper- und Organmassen wurden mit dem Programm Excel des Office Paketes 2000 und mit dem Programm SPSS Version 10 bearbeitet.

Hierbei kamen folgende Testverfahren zur Anwendung: Mit Excel wurden die Diagramme zur Verdeutlichung der Ergebnisse erstellt. SPSS bot die Möglichkeit, den Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test) anzuwenden und die Ergebnisse anhand von Boxplots darzustellen. Für die einzelnen Gewichte wurden Maximum, Minimum, Median (\tilde{x}) und die Quartile tabellarisch aufgeführt.

Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (U-Test)

Dieser Test zählt zu den nichtparametrischen Testverfahren. Voraussetzung für den U-Test ist die Unabhängigkeit zweier Stichproben mit gleicher Verteilungsform.

Es wurde folgende Nullhypothese überprüft: Die Massenverteilung der Gruppe LV und der Gruppe OLV stimmt bezüglich ihrer Lage überein.

Der Boxplot

Der Boxplot gibt die graphische Darstellung einer Untersuchung von mehreren Proben wieder. Hierbei werden die Ergebnisse anhand einer Box dargestellt, welche vom ersten und dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt wird. Eine in der Box liegende, dick dargestellte Linie beschreibt den Median der Proben. So genannte Extremwerte werden als Sternchen wiedergegeben, wenn sie sich mehr als drei Kastenlängen außerhalb der Box befinden. Liegen Werte zwischen 1,5 und 3 Kastenlängen außerhalb der Box, werden sie als Kreise wiedergegeben und als Ausreißer bezeichnet (Bühl u. Zöfel 2000).