

5 Diskussion

In der vorliegenden Studie wurden zunächst Schlachtkörper- und Organmassen von Jungmasthühnern auf ihre Beeinflussung durch ALV-J-Infektionen und Leberveränderungen hin geprüft. Eine weitere Zielstellung der vorliegenden Arbeit war, bei geschlachteten Jungmasthühnern mit pathologischen Leberveränderungen zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß diese makroskopisch sichtbaren Prozesse auf eine für das Vorliegen einer ALV-J-Infektion charakteristischen Myelozyten-Akkumulation zurückzuführen oder mit ihr vergesellschaftet sind. Auch andere Organe wurden histologisch auf ALV-J-relevante Myelozyten-Infiltrate geprüft. Zur ätiologischen Absicherung wurden weiterhin die Elektronenmikroskopie zum Nachweis von Typ-C-Partikeln und PCR-Methoden zum definitiven Nachweis von ALV-J-Genomsequenzen eingesetzt.

5.1 Erfassung der Schlachtkörper- und Organmassen

Im Vorgriff auf die nachfolgend zu besprechenden Ergebnisse, soll an dieser Stelle schon erwähnt werden, dass bei 60 der 74 Proben (52 Tiere der Gruppe LV und 8 Tiere der Gruppe OLV) anhand molekularbiologischer Techniken Genomsequenzen von ALV-J nachgewiesen wurden.

Die Ermittlung der Massen erbrachte folgende Ergebnisse (siehe 4.1 Ergebnisse der Massenerfassung und Tabelle I, Anhang 1):

1. Der Median der **Schlachtkörpermassen** lag bei den Tieren der Gruppe LV bei 793,1 g. Bei den Tieren der Gruppe OLV betrug dieser Wert 1254,8 g. Somit ergibt sich eine Differenz von 461,7 g bei den Medianen der Schlachtkörpermassen von Gruppe LV und Gruppe OLV. Die Hühner mit pathologischen Leberveränderungen wiesen im Vergleich mit den Hühnern ohne pathologische Leberveränderungen nur 63,2% der Schlachtkörpermasse auf.
2. Die untersuchten **Lebern** der Gruppe LV (Median der Massen = 45,2 g) wiesen ein signifikant höheres Gewicht als die Lebern der Gruppe OLV (Median der Massen = 35,5 g) auf. Die Mediane der Lebermassen von Gruppe LV und Gruppe OLV unterscheiden sich um 9,7 g. Somit wiesen die Tiere der Gruppe OLV nur 78,54% der Lebermasse der Gruppe LV auf.
3. Der Median der **Herzmassen** lag bei den Hühnern der Gruppe OLV mit 9,1 g signifikant höher als bei der Gruppe LV (7,3 g). Der Unterschied beträgt 1,8 g.

Beim Vergleich der Schlachtkörpermassen der beiden Gruppen wird deutlich, dass bei der Gruppe LV eine deutlich niedrigere Schlachtkörpermasse ermittelt wurde (Tabelle I, Anhang 1).

Bei der Betrachtung der Schlachtkörpermassen im Vergleich mit den histologischen Ergebnissen (Tabelle I und II, Anhang 1) zeigt sich, dass die Tiere mit Myelozyten-Akkumulation und weiteren histopathologischen Befunden in der Leber ein deutlich erniedrigtes Schlachtkörpergewicht aufwiesen. Im Einzelnen bedeutet dies:

- 11 der 13 Tiere (= 84,62%), bei denen in den histologischen Leberpräparaten multiple Myelozyten-Akkumulationen leicht auffindbar waren (+++), wiesen eine Schlachtkörpermasse unter 1000 g auf.
- Von den 20 Tieren, bei denen Myelozyten-Akkumulationen in den Leberpräparaten vereinzelt auftraten (++) , lag das Schlachtkörpergewicht bei 18 (= 90%) Tieren unter 1000 g.
- 19 der 28 (= 67,86%) Tiere, bei denen Myelozyten-Akkumulationen erst durch intensives Durchmustern der Schnittpräparate gefunden wurden (+), wiesen eine Schlachtkörpermasse unter 1000 g auf. Von den 9 Tieren, deren Schlachtkörpermasse über 1000 g lag, zählten 8 zu der Gruppe OLV (= 80,89%).
- Von den 13 Tieren, welche keine Myelozyten-Akkumulationen in den Leberpräparaten aufwiesen (-), lag bei 10 Tieren (= 76,92%) die Masse unter 1000 g. Diese Tiere entstammten alle der Gruppe LV und wiesen histologisch und makroskopisch Leberveränderungen in Form von Nekrosen und Ansammlungen von heterophilen Granulozyten und Bindegewebszubildungen auf. Zwei der Tiere, bei denen keine Akkumulationen gefunden wurden und die Schlachtkörpermasse über 1000g, entstammten der Gruppe OLV, eines der Gruppe LV.

Die Tiere der graduellen Einteilung +++ und ++ wiesen zu 84,62 bis 90% eine Schlachtkörpermasse unter 1000g auf. Diese Tiere (alle aus der Gruppe LV) wiesen eine signifikant höhere Lebermasse im Vergleich zu der Gruppe OLV auf. Die Diskrepanz, dass auch Tiere ohne Myelozyten-Akkumulationen ein vermindertes Schlachtkörpergewicht aufwiesen, ist durch die vermutlich bakteriell bedingte Erkrankung dieser Tiere erklärbar. Die Lebern dieser Tiere wiesen im Mittel eine Masse von 32,05g auf.

Ein Zusammenhang zwischen Akkumulationen von Myelozyten und verminderter Schlachtkörpermasse mit erhöhter Lebermasse ist aus den Messungen ersichtlich.

Beim Vergleich der **Schlachtkörpermassen** mit den molekularbiologischen Ergebnissen (Tabelle I und III, Anhang 1) zeigt sich, dass von den 60 Tieren, welche in einer der angewendeten molekularbiologischen Techniken ALV-J-Genomsequenzen aufwiesen, 15 Tiere schwerer als 1000 g waren. Somit wurde bei 25% der ALV-J positiven Tiere ein Schlachtkörpergewicht über 1000 g ermittelt. Von diesen 15 Tieren zählen 8 (= 60%) zu der Gruppe OLV.

Wie Payne (1998a) zeigte, resultiert eine Massenreduktion nach einer embryonalen Infektion mit ALV-J. Dies ist weniger der Fall, wenn die Infektion erst nach dem Schlupf erfolgt. Auch

Stedman und Brown (1999) zeigten in einem Versuch mit 40 Hühnern, dass nach embryonaler Infektion die Körpermasse der entwickelten, infizierten Hühner nur bei 63,8 bis 68,4% der Masse nicht infizierter Hühner lag. Der Grund für das verminderte Wachstum ist nach Meinung dieser Autoren noch unklar.

Bei 9 Tieren der Gruppe LV aus der vorliegenden Untersuchung konnten mit molekularbiologischen Techniken keine ALV-J-Genomsequenzen gefunden werden. Somit sind 85,94% der Tiere der Gruppe LV mit ALV-J infiziert gewesen. Dies lässt die Vermutung zu, dass ein Teil der Reduktion der Körpermasse auf die Infektion mit dem Aviären Leukosevirus Subtyp J zurückzuführen ist. Da die Gruppe OLV jedoch zu einem großen Teil ebenfalls mit ALV-J infiziert war (8 von 10), stellt sich hier die Frage, warum die Körpermasse dieser Tiere nicht reduziert war (Median = 1254,8 g). Wie Payne (1998a) und Stedman und Brown (1999) zeigten, kommt eine Massenreduktion nur bei embryonal, nicht aber bei horizontal infizierten Tieren vor. Dies lässt vermuten, dass die 8 Tiere der Gruppe OLV, welche ALV-J positiv getestet wurden, erst nach dem Schlupf infiziert wurden.

ALV-J wird den langsam transformierenden Viren zugeordnet. Ein Ausbruch der Erkrankung ist somit erst nach Wochen bis Monaten zu erwarten (Payne 1998b). Da alle Tiere in etwa gleich alt waren, lässt dies den Schluss zu, dass bei den Tieren der Gruppe LV, welche embryonal infiziert wurden, die Erkrankung schon ausgebrochen war, bei den Tieren der horizontal infizierten Gruppe OLV jedoch noch nicht. Dies geht konform mit den Ergebnissen von Fadly et al. (1999) und Witter (1997), welche bei 4 Wochen alten Hühnern Krankheitserscheinungen fanden. Payne (1998a) beschreibt das Vorkommen von ALV-J bei 5 Wochen alten Masthühnern.

Als weitere Gründe für die Reduktion der Körpermassen sind die teilweise schweren pathohistologischen Veränderungen der Leber und somit ihre eingeschränkte Organfunktion zu nennen. Es gilt zu bedenken, dass nur 6 Tiere der Gruppe LV außer den Myelozytenansammlungen keine pathohistologischen Veränderungen der Leber aufwiesen (siehe Tabelle II, Anhang 1). Eine embryonale ALV-J-Infektion ist somit wahrscheinlich, jedoch können diese Leberveränderungen auch allein für eine derartige Massenreduktion verantwortlich sein.

Die Massenzunahmen der **makroskopisch veränderten Lebern** sind durch die Ansammlungen von Myelozyten sowie durch die Zunahme des Reparations- und Bindegewebes erklärbar. Die Akkumulationen von Myelozyten beeinträchtigen ebenso die Organfunktion wie die anderen histologisch nachgewiesenen, pathologischen Erscheinungen (Entzündungsreaktionen, Granulome, Leberzellverfettung, Blutungen, Fibrosarkome und Gallenpigmentablagerungen).

Bei den Messwerten der **Herzmassen** handelt es sich um absolute Zahlen und nicht um Werte, die in Bezug zur Schlachtmasse gesetzt wurden. Hierdurch wird ein Zusammenhang

zwischen der erniedrigten Schlachtkörpermasse und der erniedrigten Herzmasse wahrscheinlich.

In der Gruppe LV wurden 3 Hühner auffällig, welche 2 ml Flüssigkeit im Herzbeutel aufwiesen. Dies deutet auf ein Hydroperikard bei diesen Tieren und somit auf eine verminderte Herzleistung hin.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei den Tieren, welche eine Infektion und Symptome von ALV-J aufwiesen, eine verminderte Schlachtkörpermasse und eine vergrößerte Lebermasse gefunden wurde. Die verminderte Herzmasse lässt sich nicht eindeutig mit der Infektion in Zusammenhang bringen, sondern ist wahrscheinlich auf die verminderte Schlachtkörpermasse zurückzuführen.

5.2 Pathologisch-anatomische Veränderungen

Die **makroskopischen Veränderungen der Lebern** (siehe 4.2.1.1 Leberbefunde) von Tieren der Typen I bis III bestanden vor allem in einer Marmorierung und einer Schwellung, sowie einer Abrundung der Leberränder. Ähnliche Beobachtungen machten auch Payne (1988, 1998a, 1998b, 2000b), Nakamura et al. (2000), Venugopal et al. (2000a), Weikel et al. (2000, 2001) und Zavala (2000). Massi et al. (2000) beschrieben infizierte Lebern als blass, verhärtet und gelblich-bräunlich.

Bei allen 18 Tieren, deren Lebern deutlich geschwollen waren, eine deutliche Läppchenzeichnung erkennen ließen und keine bis nur vereinzelt stecknadelkopfgroße, weißliche Herde auf der Oberfläche aufwiesen (Lebertypkategorie I), wurden molekularbiologisch Gensequenzen von ALV-J nachgewiesen (siehe Tabelle IV, Anhang 1). Weiterhin ist auffällig, dass in der Lebertypkategorie I mit Ausnahme einer Leber alle Leberproben histologisch Akkumulationen von Myelozyten aufwiesen (siehe Tabelle IV, Anhang 1).

In den Lebern der beiden anderen Lebertypkategorien mit Leberschwellung und Marmorierung (Typ II und III) wurde lichtmikroskopisch bei 31 von 39 Tieren der Nachweis von Myelozyten-Herden erbracht. Bei einem Tier der Kategorie II und bei sieben Tieren der Kategorie III wurden histologisch keine Myelozyten gefunden. Molekularbiologisch konnten bei den 20 Tieren der Kategorie II Gensequenzen neuerer Isolate von ALV-J detektiert werden. Von den 19 Tieren der Kategorie III waren sechs molekularbiologisch negativ, und bei einem Tier dieses Typs stellte sich ein fragliches Ergebnis heraus.

Makroskopisch wurde der Lebertyp V mit grauweißen, unterschiedlich großen, derb-speckigen, z. T. konfluierenden Herden beschrieben.

In zwei Fällen (je ein Mal Lebertyp II und V) wurden feste Zubildungen im Leberparenchym ertastet, welche sich histologisch als Sarkome erwiesen. Die Konsistenz der Tumoren war fest, und im Anschnitt wiesen sie eine speckige, hellgelbliche Farbe auf. Sie drängten das

umliegende Gewebe zurück. Diese Tiere wiesen histologisch Akkumulationen von Myelozyten im Leberparenchym auf.

Auch Arshad et al. (1997a) fanden bei ihren Untersuchungen Sarkome bei Hühnern, welche mit ALV-J infiziert waren. Ebenso beschrieb Payne (2000b) das Auftreten von Sarkomen im Zusammenhang mit einer ALV-J-Infektion. Das Vorhandensein von derartigen Tumoren stellt somit keinen Widerspruch zur ALV-J-Infektion dar.

In der vorliegenden Untersuchung lagen 5 Tiere (zwei Mal Lebertypkategorie I und drei Mal Lebertypkategorie II) vor, welche histologisch und molekularbiologisch eine ALV-J-Infektionen aufwiesen und bei denen außer den Myelozyten-Akkumulationen keine weiteren histologischen Veränderungen zu finden waren.

Die makroskopischen Veränderungen des **Knochenmarkes** sind mit den Beobachtungen von Nakamura et al. (2000) vergleichbar. Diese Autoren beschreiben das Knochenmark infizierter Tiere als blass. Die Farbe des Knochenmarkes des Femurknochens der hier untersuchten Hühner erwies sich als hellrot und blass. Die Konsistenz des Knochenmarkes bei den Tieren der Gruppe LV der vorliegenden Arbeit war häufig sulzig.

Die Makroskopie der **Milz** wies im Allgemeinen keine Besonderheiten auf. Nur eine Milz hatte eine Metastas eines Fibrosarkomes (siehe Abb. 12). Die in der Literatur zu findenden Angaben weichen hiervon ab. Einige Autoren sprechen von Vergrößerungen des Organs (Nakamura 2000) oder von Knötchen in der Milz, welche teilweise das Oberflächeniveau überragten (Venugopal et al. 2000, Wang und Yuan 2000).

Die **Nieren** schienen mit dem bloßen Auge unauffällig. Eine Ausnahme bildete das Huhn, welches mehrere Sarkome aufwies. Bei diesem Huhn wurden auch in der Niere grobknotige Veränderungen auffällig. Auch Arshad et al. (1997a), Payne (1988a), Aly (2000), Nakamura (2000) und Wang und Yuan (2000) beschrieben Tumoren der Nieren im Zusammenhang mit einer ALV-J-Infektion.

Zusammenfassend ist zu den makroskopischen Auffälligkeiten zu sagen, dass die dezenten Veränderungen der Lebern wie Marmorierung, Schwellung und Abrundung der Leberländer auf eine Infektion mit dem Subtyp J der ALV hinweisen. Diese Veränderungen wiesen vor allem die Lebern der Kategorie I auf. Es gilt zu bedenken, dass nur 18 der 64 Tiere der Gruppe LV in diese Gruppe eingestuft wurden. Auf Grund der geringen Tierzahl ist nicht auszuschließen, dass mögliche folgende Untersuchungen Tiere aufzeigen, welche makroskopisch den Lebern der Kategorie I entsprechen, jedoch nicht mit der Subgruppe J infiziert sind.

Die Typen II und III wiesen zusätzlich zu der Marmorierung und Schwellung noch Nekroseherde auf. Bei diesen Tieren weist das pathologisch-anatomische Bild auf eine ALV-J-Infektion hin, jedoch vor allem in der Kategorie III ist eine Infektion mit anderen, insbesondere bakteriellen Erregern eher wahrscheinlich.

Bei den 8 Tieren der Gruppe LV, welche histologisch keine Akkumulationen von Myelozyten zeigten, resultiert die Schwellung der Leber von den histologisch beschriebenen pathologischen Veränderungen wie entzündliche Erscheinungen, Gallengangsproliferationen, Granulome, Blutungen oder Verfettung (Tabelle II, Anhang 1).

Sarkome im Lebergewebe können bei einer ALV-J-Infektion vorkommen. Sie sind jedoch als Hinweis auf eine derartige Infektion nicht ausreichend, da das Vorkommen derartiger Umfangsvermehrungen im Zusammenhang mit einer ALV-J-Infektion selten beschrieben wird.

Außer den makroskopischen Veränderungen der Leber sind die des Knochenmarkes ein weiteres, wenn auch unsicheres Indiz für eine Infektion mit dem Subtyp J. Jedoch ist die Betrachtung der Farbe und der Konsistenz des Knochenmarkes in der Praxis untersuchungstechnisch wenig gebräuchlich und daher als makroskopisches Symptom für eine ALV-J-Infektion nicht verwertbar.

Schlussfolgernd ist zu sagen, dass pathologisch-anatomisch etwa unter den Verhältnissen der Geflügelfleischuntersuchungen am Schlachtband die Diagnose einer ALV-J-Infektion nicht sicher zu treffen ist, da die Veränderungen zu uncharakteristisch sind. Lediglich der Verdacht wäre zulässig, wenn die Lebern mit abgerundeten Rändern vergrößert erscheinen und eine Marmorierung aufweisen. Diese Einschätzung müsste dann durch genauere Testverfahren (PCR) belegt werden.

5.3 Histologische Organveränderungen

Die histologische Untersuchung der **Lebern** der Gruppe LV und der Gruppe OLV zeigte im Parenchym Ansammlungen von Myelozyten. Diese wurden vorwiegend in den periportalen Feldern gefunden. Die Zellen wiesen folgende Kriterien auf: polymorphe Gestalt, meist jedoch rund, mit eosinophilen Granula im blass basophilen Zytoplasma und einem runden bis ovalen, großen Kern ohne Segmentierung. Das Chromatin des Zellkernes war aufgelockert, und die Anzahl der Kernkörperchen variierte. Mitosestadien wurden selten gefunden.

Diese Myelozyten kommen außerhalb des Knochenmarkes und in dieser Anzahl nur bei der Myeloischen Leukose vor. Payne et al. (1991) betrachten den histologischen Nachweis von Myelozyten in der Leber als eindeutigen Beweis für eine AML und das Vorhandensein einer ALV-J-Infektion. Derartige Nachweise von Myelozyten im Zusammenhang mit einer ALV-J-Infektion gelangen auch Payne (1998a; 1998b; 2000b), Nakamura et al. (2000), Venugopal et al. (2000a) und Weikel et al. (2000; 2001).

Als Ursachen der Myeloischen Leukose kommen mehrere Subtypen der Aviären Leukoseviren in Frage. Die Stämme MC29, CMII und OK10 mit dem Oncogen *myc* (Transkriptionsfaktoren) verursachen Myeloleukose der myelomonozytären Ziellinie. Der

Stamm BAI-A enthält das Oncogen *myb* (Transkriptionsregulator) und induziert Myeloblastose der Myelozyten. Der Stamm E26 der Aviären Myeloblastoseviren (AMV) enthält die Oncogene *myb* und *ets* und induziert myeloblastische Veränderungen der Myelozyten (Payne 1998b). Jedoch gilt als häufigster Auslöser der Aviären Myeloischen Leukose seit einigen Jahren die Subgruppe J der ALV (Fadly und Smith 1999).

Das Alter der untersuchten Tiere lag bei ca. fünf Wochen. Das Vorkommen von AML und die dazugehörigen histologischen Veränderungen werden vor allem bei älteren Legehühnern beschrieben (Payne 1998a). Jedoch zeigten bereits schon andere Autoren das Auftreten dieser Erkrankung bei solch jungen Masthühnern (Payne et al. 1992; Witter 1997; Fadly und Smith 1999). Da die vertikale Übertragung des Virus als gesichert gilt (Fadly und Okazaki 1982), kann davon ausgegangen werden, dass die Manifestation der Symptome schon mit vier Wochen oder noch früher beginnt, jedoch erst mit 20 oder mehr Lebenswochen das Vollbild der Krankheit mit den dazugehörigen Tumoren an den Knochen, in der Leber, in der Milz, in den Gonaden und in den Nieren entwickelt.

Die **weiteren histologischen Ergebnisse** gehen konform mit den in der Literatur beschriebenen Organveränderungen. Arshad et al. (1997a) wiesen bei Küken, welche an einer ALV-J-Infektion litten, Sarkome nach. Histiocytaire Sarkome, Erythroblastose, KeimzellTumoren, SternzellTumoren, Fibrosarkome, Hämangiome und Hämangiosarkome, Lymphome, Nierenadenome und Nierenkarzinome, Mesotheliome, Myxosarkome, Ovarkarzinome sowie Plasmazellenleukämie wurden von Payne (2000b) bei seinen Untersuchungen gefunden. Weiterhin beschreiben Nakamura et al. (2000) Fibrosarkome, histiozytaire Sarkome, Adenokarzinome und Leiomyosarkome bei einem Tier, welches an AML erkrankte.

Bei der vorliegenden Untersuchung wurden bei einem Tier **Sarkome** in der Leber, in den Nieren und Nebennieren, in der Lunge, an den Rippenbögen, dem Synsacrum und anderen Knochen der Wirbelsäule gefunden. Hier stellten sich die Tumoren als speckige, grauweiße, erbsen- bis walnussgroße und festelastische Zubildungen dar. Histologisch wurden sie als Fibrosarkome identifiziert. Ein weiteres Tier wies Fibrosarkome im Lebergewebe auf. Bei beiden Tieren wurde mit molekularbiologischen Techniken der Nachweis einer ALV-J-Infektion erbracht (Tabelle II und IV, Anhang 1).

Bei den histologischen Untersuchungen der Gruppe LV wurden Myelozyten-Akkumulationen außer in der Leber auch im **Herzmuskel**, in den **Nieren**, in der **Lunge**, im **Drüsenmagen**, in den **Nebennieren** und im **Dickdarm** gefunden. Diese Lokalisation von Myelozyten bei einer Infektion mit ALV-J entsprechen der in der Literatur beschriebenen Manifestationen

Die histologische Untersuchung des **Knochenmarkes** wurde bei 31 Tieren durchgeführt. 18 Mal konnte eine Zellproliferation der myeloischen Entwicklungsreihe gezeigt werden. 13 der untersuchten Tiere wiesen keine Besonderheit des Knochenmarkes auf. Im Einzelnen lassen

sich die Ergebnisse wie folgt darstellen, wobei die Ergebnisse teilweise mit den Ergebnissen der PCR nicht konform gingen:

1. 18 untersuchte Knochenmarksproben erbrachten mit den histologischen und molekularbiologischen Untersuchungsverfahren vergleichbare Ergebnisse. Es handelte sich um 11 Tiere, welche histologisch ein myeloisch verändertes Knochenmark aufwiesen und in der PCR ALV-J-spezifische Banden zeigten, und um sieben Tiere, die histologisch kein auffälliges Knochenmark aufwiesen und molekularbiologisch keine ALV-J-Sequenzen nachgewiesen wurden.
2. Mit den PCR-Techniken wurde bei 11 der 31 Tiere ALV-J nachgewiesen, histologisch wurde bei der Untersuchung des Knochenmarkes dieser Tiere jedoch kein Hinweis auf AML gefunden. Hierbei ist zu bedenken, dass acht dieser 11 Tiere zu der Gruppe OLV zählen. Die Gruppe OLV wurde makroskopisch am Schlachtband als unauffällig eingestuft. Die Diskrepanz zwischen dem Fehlen von Veränderungen des Knochenmarkes und der Leber und einer bestehenden Infektion ist dadurch zu erklären, dass diese Tiere das Virus in sich trugen, es aber noch nicht zur Transformation der Zielzellen gekommen war. Dies wäre im Falle einer horizontalen Infektion möglich.
3. Bei zwei Tieren der Gruppe LV, die lichtmikroskopisch durch die Knochenmarksuntersuchung eine Zunahme der Zellen der myeloischen Entwicklungsreihe zeigten, wurden jedoch mit den molekularbiologischen Techniken keine ALV-J-Sequenzen gefunden. Grund hierfür können Mutationen im Primerbereich sein, welche eine Detektion des Virus verhindern. Die Zunahme der myeloischen Entwicklungsreihe im Knochenmark kann aber in diesen Fällen auch als Reaktion auf andere pathogene Reize stattgefunden haben und somit als physiologische Abwehrreaktion definiert werden.

Es ist anzumerken, dass eine Entzündung meist eine Aktivierung des Knochenmarkes zur Folge hat. Die daraus resultierende Proliferation der Entzündungszellen mit Verschiebungen in der myeloischen Entwicklungsreihe ist histologisch jedoch durch die Art der Zellen und durch das Verhältnis zwischen reifen und unreifen Granulozyten abzugrenzen.

Weiterhin ist zu bemerken, dass bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen die Funde von juvenilen Heterophilen in den Organen immer ein Hinweis auf eine entzündliche Reaktion sein können. Solche Reaktionen können unter anderem auch durch bakterielle Erreger hervorgerufen werden, sind aber von Myelozyten-Akkumulationen im Sinne einer Aviären Leukose ebenfalls durch die Morphologie der Zellen und der Lage innerhalb des Organes abgrenzbar.

Entzündliche Reaktionsvorgänge werden auch in Zusammenhang mit einer ALV-J-Infektion beschrieben. Payne (2000b) und Venugopal et al. (2000a) führten solche entzündlichen

Erscheinungen, welche vor allem in der Leber von natürlich und experimentell mit ALV-J infizierten Tieren gefunden wurden, auf. Die Autoren bezeichneten diese Funde als „Lymphomyeloide Hyperplasie“. Diese Reaktionen sind Folgen der horizontalen Infektion und der Immunantwort.

Das Auffinden von Myelozyten-Akkumulationen vor allem in der Leber, aber auch in anderen Organen ist somit ein Indiz für das Vorhandensein einer ALV-J-Infektion. Payne et al. (1991) beschreiben solche Funde sogar als pathognomonisch für eine derartige Infektion.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass eine Infektion der fünf Wochen alten Schlachtmasthühner möglich ist und dass diese sich durch Akkumulation von Myelozyten im periportalem Gewebe der Leber und im Knochenmark sowie in weiteren Organen wie dem Herzmuskel, den Nebennieren, dem Darm und der Lunge auszeichnet. Sarkome können bei einer derartigen Infektion vorkommen, sind aber nicht die Regel.

5.4 Nachweise von Myelozyten-Akkumulationen

Die mit den histologischen Untersuchungen der anderen Organe (siehe 4.3.1 Nachweis von Myelozyten und 4.3.1.3 sonstige Organe) erbrachten Ergebnisse lassen sich zu großen Teilen auf eine Streuung der Myelozyten in die angegebenen Organe zurückführen.

Auffallend war, dass in der **Milz** keine und in den **Nieren** nur wenige Myelozytenherde vorkamen (siehe 4.3.1 Nachweis von Myelozyten). Als empfängliche und am häufigsten mit dem ALV-J befallenen Organe und deren Zellen beschreibt Arshad et al. (1997b) die Nebennieren, den Herzmuskel, die Nieren, den Vormagen und andere Darmregionen. Fadly und Smith (1999) und Fadly (2000) geben als Organe, in denen Myelozyten gefunden werden können, die Leber, die Milz, die Nieren und das Sternum an. Im Gegenteil zu Nakamura et al. (2000), welche Myelozyten mit vielen Mitosestadien in allen untersuchten Knochen, in der Leber, in der Milz, in den Nieren, in der Lunge, im Herzmuskel in den Ovarien und im Darm fanden, wurden bei der vorliegenden Untersuchung nur wenige Mitosestadien der Myelozyten gesehen.

Myelozyten wurden bei 3 Tieren in der Schleimhaut des **Drüsenmagens** und bei 2 Tieren in der Schleimhaut des **Dickdarms** gefunden.

Die histologischen Ergebnisse der **Herzuntersuchung** erbrachten, dass 19 Tiere in der Herzmuskulatur Myelozyten aufwiesen. 6 dieser Tiere stammten aus der Gruppe OLV. Insgesamt wurden 65 histopathologisch veränderte Herzen untersucht. Bergmann et al. (1988) untersuchten 80 Masthühner mit Symptomen des plötzlichen Herz-Kreislauf-Versagens und 55 klinisch gesunde Tiere. In beiden Tiergruppen wurden histologisch quantitativ und qualitativ vergleichbare Zellinfiltrate (heterophile Granulozyten und Lymphozyten) gefunden. Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass der Fund von derartigen Zellen wenig diagnostische und pathogenetische Bedeutung hat. In der vorliegenden Studie

wurde außer den Myelozyten 10 Mal lymphozytäre Infiltration und 38 Mal eine heterophile, granulozytäre Infiltration aufgezeigt. Die Ergebnisse überschneiden sich teilweise. Pathohistologische Funde von lymphozytären oder/und heterophilen, granulozytären Infiltrationen sind nach der zitierten Literatur von untergeordneter Bedeutung für die Gesundheit der Hühner.

5.5 Weitere histologische Befunde in der Leber und anderen Organen

Die weiteren histopathologischen Veränderungen (Granulome, Nekrosen, Bindegewebszubildungen, Gallengangsproliferationen und Gallenpigmentablagerungen) in der Leber (siehe 4.3.1.2 Sonstige histopathologische Veränderungen in der Leber) konnten in keinen Zusammenhang mit den Myelozyten-Akkumulationen gebracht werden. Die Lage der Akkumulationen, ihre Häufigkeit, ihr Vorkommen mit anderen histopathologischen Funden und die Tatsache, dass es sowohl Lebern mit Myelozyten, aber ohne weitere pathologische Befunde (4 Tiere der Gruppe LV und 8 Tiere der Gruppe OLV, Tabelle II, Anhang 1), als auch nur die beschriebenen pathologischen Befunde gab (9 Tiere der Gruppe LV, Tabelle II, Anhang 1), lässt den Schluss zu, dass die histopathologischen Leberveränderungen auf Grund von anderen Ursachen als der Subgruppe J, insbesondere bakteriellen Erregern, aufgetreten sind.

Es wurde nur ein Huhn in der Gruppe LV gefunden, bei dem weder Myelozyten noch andere histopathologische Befunde zu finden waren. Dieses Huhn wurde in die Gruppe LV eingeordnet und mituntersucht, da es am Schlachtband mit einer grünlich-schwarz verfärbten Leber (Lebertyp VI) auffiel. Bei diesem Tier wurden keine Akkumulationen im Lebergewebe gefunden, und molekularbiologisch wurde auch keine ALV-J spezifische Bande erzeugt.

Da das Knochenmark als Ursprungsort der Myelozyten in seiner Funktion eingeschränkt ist, könnte vermutet werden, dass das Immunsystem geschwächt wurde. Dieser Aussage widerspricht allerdings Shane (2001). Der Autor führt an, dass im Gegenteil zu früheren Ausführungen eine ALV-J-Infektion unter Laborbedingungen nicht immunsuppressiv wirkt. Diese Meinung teilen Stedmann et al. (2000). Ihren Untersuchungen an Heterophilen, Makrophagen und Lymphozyten bei Hühnern zufolge sind diese Zellen nach einer ALV-J-Infektion zwar in der Geschwindigkeit bei der Vernichtung von Erregern verlangsamt, ihre Funktion ist aber weiterhin vollständig vorhanden. In allen untersuchten Zellen wurde provirale RNA gefunden. Als Resultat bliebe nur die Vermutung, dass die in dieser Untersuchung ausgewählten Hühner zusätzlich zu ALV-J noch mit weiteren pathogenen Erregern infiziert waren. Die makroskopische Wahl der Tiere der Gruppe LV lässt diese Einschätzung zu.

5.6 Elektronenmikroskopische Aussagen

Mit der **Dünnschnitttechnik** wurden Partikel gefunden, welche morphologisch die Strukturmerkmale der Retroviren zeigten. Ein „Budding“ wurde in keiner der untersuchten Proben bestätigt. Daher konnten diese Strukturen nicht eindeutig als Retroviren klassifiziert werden (siehe 4.4.1 Dünnschnitttechnik und 4.4.2 Negativkontrasttechnik). Die Kriterien, welche für retrovirusähnliche Partikel sprechen, sind die Größe der Viren, welche mit ca. 100 nm an der oberen Grenze der Retroviren liegt, und die Form. Retrovirusähnliche Partikel werden in der Literatur als runde, ca. 80 nm große Partikel beschrieben Nakamura et al. (2000). Die Größe des behüllten Virus beschreibt Venugopal (1999) mit 100nm. Im vorliegenden Fall wurden runde bis ovale Partikel mit einer Größe bis 100nm als „retrovirusähnlich“ beschrieben.

Die mit dem Virus befallenen Myelozyten erschienen in der vorliegenden Untersuchung wie in der Literatur beschrieben. Nach Nakamura et al. (2000) stellen sich Tumorzellen ultrastrukturell mit einem großen runden Kern und mit großen, elektronendichten Granula im Zytoplasma dar. Typ-C-Partikel, welche in den Zellen zu finden sind, werden mit einer Größe von 80 bis 100 nm beschrieben. Viruspartikel werden nur selten in Vesikeln des Zytoplasmas von Tumorzellen gefunden.

Auch die in dieser Studie mit der Dünnschnitttechnik bearbeiteten Proben ließen Myelozyten mit einem großen Kern erkennen. Im Zytoplasma befanden sich elektronendichte Granula. Die Größe der virusähnlichen Partikel betrug ca. 100 nm. Sie lagen frei im Zytoplasma. Vesikel mit Viruspartikeln wurden nicht entdeckt. Anhand dieser Eigenschaften lässt sich schlussfolgern, dass es sich in der vorliegenden Untersuchung um Retroviren gehandelt hat. In der **Negativkontrasttechnik** stellten sich die gefundenen Viren als runde, behüllte Partikel mit einem ikosaedrischen Kapsid dar. Ihre Größe betrug 80 – 100 nm. Die Virushülle war auf der äußeren Seite uneben und erschien zweischichtig. Somit entsprechen die beschriebenen Partikel den morphologischen Kriterien von aviären Retroviren wie sie Murphy et al. (1999) beschrieben.

Insgesamt wurden mit der Negativkontrasttechnik 44 Knochenmarkspräparaten (43 Proben aus der Gruppe LV und 1 Probe aus der Gruppe OLV) und in 34 Leberpräparaten (Gruppe LV) retrovirusähnliche Strukturen gefunden. Im **Vergleich mit den molekularbiologischen Ergebnissen** ergeben sich folgende Aussagen: Sieben Tiere zeigten virusähnliche Partikel ausschließlich in den Leberpräparaten und nicht im Knochenmark. 14 Tiere wurden untersucht, bei denen ausschließlich in den Knochenmarkspräparaten, aber nicht in den Leberpräparaten virusähnliche Partikel entdeckt wurden. Die PCR wies bei all diesen Tieren ALV-J-Genomsequenzen nach. Dass nur in einer der untersuchten Proben elektronenmikroskopisch Virusmaterial gefunden wurde, ist für das Ergebnis nicht ausschlaggebend. Der elektronenmikroskopische Fund von Virusmaterial in einer der Proben ist als positives

Ergebnis zu werten. Daher gehen diese elektronenmikroskopischen Ergebnisse mit den Ergebnissen der PCR konform. Das negative Ergebnis der untersuchten Probe des Darminhaltes oder der Leber durch die ELMI lässt vermuten, dass die Viruskonzentration in diesen Proben zu gering war. Die Sensitivität der PCR ist weit höher als die der Elektronenmikroskopie. Dies gilt auch für die 18 Tiere, bei denen in der PCR positive Ergebnisse erbracht wurden, elektronenmikroskopisch jedoch kein Virus nachgewiesen wurde.

Es wurden bei sechs Tieren elektronenmikroskopisch in den Leber- und in den Knochenmarkspräparaten Retroviren gefunden, bei denen molekularbiologisch jedoch kein Nachweis von ALV-J zu erbringen war. Diese Diskrepanz lässt sich dadurch erklären, dass möglicherweise aviäre Retroviren anderer Gruppen gesichtet wurden.

Eine andere Erklärung für einen derartigen Unterschied zwischen Elektronenmikroskopie und Molekularbiologie wäre die hohe Mutationsraten der Retroviren, die durch Payne et al. (1993a), Payne (1998a; 2000a), Smith et al. (1998b), Venugopal et al. (1998) und Fadly (2000) beschrieben wurden. Fadly weist auf Mutationsrate hin, welche in Bezug mit PCR-Techniken zu falschen Ergebnissen führen können. Liegen die Mutationen im Bereich der Primer, kann die Genomsequenz nicht mehr amplifiziert werden, und ein falsch negatives Ergebnis liegt vor. In diesem Fall würde sich die PCR als ungenügend für eine ALV-J-Untersuchung erweisen.

Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass durch die elektronenmikroskopische Untersuchung bei 64,86% der untersuchten Tiere Typ-C-Partikel gefunden wurden. Der weitaus höhere Nachweis von ALV-J-Genomsequenzen durch die PCR (83,73%) geht auf die weit höhere Spezifität und Sensitivität der Methode zurück.

5.7 Ergebnisse der PCR

Molekularbiologische Methoden wie die PCR führen zu schnellen Ergebnissen, welche in Massenuntersuchungen kostengünstig und einfach in der Handhabung sind. Die Auswertung der Ergebnisse ist durch Ablesen von spezifischen Banden auf Polaroidfotos erleichtert und für große Probenvolumina geeignet. Es stehen mehrere molekularbiologische Testverfahren zur Verfügung.

5.7.1 DNA-PCR

Die DNA-PCR wurde bei insgesamt 35 Lebern angewandt. 15 dieser Proben zeigten positive Reaktionen, 19 negative und eine Probe wies nicht auswertbare Ergebnisse auf (Mehrfachbanden).

Die Methode stützt sich auf die Arbeit von Smith et al. (1998). Hierin wird der Vorgang der PCR beschrieben und es werden mehrere Primer zur Durchführung angeboten: H5 als Plusprimer, H2, H7 und ADI als Minusprimer.

In der Kombination H5 mit H2 wird das Original HPRS-103 amplifiziert. Das Produkt enthält 764 Basenpaare. In der Kombination H5 mit H7 werden alle ALV-J inklusive deren Varianten amplifiziert. Das Produkt enthält 545 Basenpaare.

Die Kombination H5 mit ADI amplifiziert die ALV A-E. Das Produkt wird durch die amplifizierten Subgruppen bestimmt und enthält demnach zwischen 295 und 326 Basenpaare.

Der Vergleich von Myelozytenakkumulationsgraden mit den Proben, welche in der PCR keine Genomsequenzen aufwiesen, wies darauf hin, dass diese Methode nicht mehr der geforderten Genauigkeit entsprach. Drei der negativ getesteten Proben wurden semiquantitativ nach histologischen Befunden in die Gruppe + eingeordnet, sieben der DNA-PCR negativen Tiere wurden in die ++ Gruppe eingestuft, fünf dieser DNA-PCR Gruppe wurden histologisch in die Fraktion +++ eingruppiert. Nur vier der PCR negativ getesteten Tiere wiesen auch histologisch keine Myelozyten-Akkumulationen auf (siehe Tabelle IV, Anhang 1). Auch in der Literatur wurde beschrieben, dass die Methode von Smith mit den genannten Primern nicht mehr alle Isolate von ALV-J erfasst (Venugopal et al. 1998).

Um die Ergebnisse zu überprüfen und um sensitivere Ergebnisse zu erhalten, wurde die Methode von Smith et al. (1998) zu einer nested DNA-PCR modifiziert. Die Software Mc Vector (3.5.2.2 Nested PCR der DNA-PCR) lieferte die Primersequenzen. Das PCR-Produkt enthält 431 Basenpaare.

5.7.2 Nested DNA-PCR

Mit der Methode der nested DNA-PCR wurden 72 Tiere untersucht. 58 Proben (50 Tiere der Gruppe LV und 8 Tiere der Gruppe OLV) wiesen Amplifikate auf. 13 Proben zeigten keine ALV-J spezifischen Banden. Zwei der negativen Proben stammten von den Tieren der Gruppe LV. Ein Ergebnis war nicht auswertbar (Mehrfachbanden). Dieses Tier wurde nicht mit der DNA-PCR untersucht.

Um die Sensitivität und Spezifität zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe der DNA-PCR und der nested DNA-PCR mit dem Referenzmaterial durchgeführt (siehe 4.5.4 Nested RT-PCR). Das Ergebnis zeigte, dass die nested DNA-PCR um den Faktor 10^4 sensitiver ist als die DNA-PCR. Zur Überprüfung der Spezifität wurden die Produkte der PCR sequenziert und mit dem Prototyp HPRS-103 (Z46390) verglichen (siehe 4.5.6 Vergleich der histologischen Funde von Myelozyten in der Leber und den molekularbiologischen Ergebnissen und Anhang 2). Eine bp-Homologie von 95 bis 97% zwischen den nested DNA-PCR-Produkten und dem äquivalenten HPRS-103 Genomteil wurde durch das Programm Navigator bestätigt.

Eine bp-Homologie von 92,3 bis 99,2% ergab sich bei den Untersuchungen von Venugopal et al. (1998). Die Streubreite der Sequenzprodukte der vorliegenden Arbeit ist somit mit den Werten der Literatur vergleichbar.

Vergleiche der DNA-PCR mit der nested DNA-PCR ergaben folgende Aussagen: 16 der mit der nested DNA-PCR positiv getesteten Tiere aus der Gruppe LV zeigten in der DNA-PCR keine Amplifikate. Alle Tiere, die mit dieser Methode untersucht wurden und negative Ergebnisse aufwiesen, zeigten in der vorangegangenen DNA-PCR ebenfalls keine Amplifikate.

Die in der DNA-PCR positiv getesteten Proben zeigten auch in der nested DNA-PCR eine spezifische Bande.

Hieraus und aus den Ergebnissen der Verdünnungsreihe ergibt sich, dass zur Untersuchung von Geflügelbeständen die nested DNA-PCR geeigneter ist als die von Smith et al. (1998) beschriebene DNA-PCR. Weiterhin zeigt diese Untersuchung, dass 58 Proben (= 80,55%) der 72 mit dieser Untersuchungstechnik geprüften Tiere eine neue Variante der Subgruppe J von ALV aufwiesen. Fadly und Smith (1997), Payne (1998a), Venugopal et al. (1998) und Venugopal (1999) wiesen darauf hin, dass durch Mutationen im Virusgenom neuere Varianten der Subgruppe J entstehen.

5.7.3 Nested RT-PCR

Die nested RT-PCR detektiert provirale RNA des Genoms der Reversen Transkriptase. Es handelt sich also um Genomsequenzen, welche noch nicht zur Replikation und somit noch nicht zur DNA-Transkription gelangen konnten. Es wurden insgesamt 17 Tiere mit dieser Methode untersucht. Die Proben zeigten teilweise zu der nested PCR abweichende Ergebnisse.

Sieben Mal wiesen beide PCR-Techniken Amplifikate auf. Fünf Tiere wurden durch die genannten PCR-Techniken als virusfrei nachgewiesen. Die nested RT-PCR (RNA-Nachweis) wies bei vier Tieren Amplifikate auf, bei denen in der nested DNA-PCR (DNA-Nachweis) keine Amplifikate gezeigt werden konnten. Das Tier, welches in der nested PCR Mehrfachbanden lieferte, zeigte auch mit der nested RT-PCR unklare Banden.

An dieser Stelle sei nochmals erwähnt, dass mit dem System von Qiagen® gearbeitet wurde, von welchem der Hersteller die RNase-Freiheit nicht garantiert und daher keine Garantie auf die Zuverlässigkeit gibt. Die Ergebnisse der nested RT-PCR sind somit nicht gesichert.

Zusammenfassung der PCR-Ergebnisse:

Insgesamt wurden 74 Proben mit PCR-Techniken untersucht (DNA-PCR, nested DNA-PCR und nested RT-PCR). 81,08% der getesteten Hühner wiesen mindestens in einer der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden ALV-J-Genomsequenzen auf. Somit ist die Verbreitung von ALV-J in den untersuchten Hühnerbeständen vergleichbar mit den Untersuchungsergebnissen von Fadly und Smith (1999). Die Autoren beziffern die Verbreitung in infizierten Herden mit bis zu 87%. Eine Virämie bei Eintagsküken soll bei 4 bis 25% vorkommen.

Im Falle der molekularbiologischen Techniken liegt die Fehlerquote in der hohen Mutationsrate der Retroviren begründet. Die ALV haben auf Grund des Fehlens eines Kontrolllese-Mechanismus des Gens die höchste Mutationsrate dieser Virusfamilie (Payne 2000a). Wenn eine solche Mutation innerhalb des zu amplifizierenden Gens liegt, resultiert dennoch ein positives PCR-Ergebnis. Die Mutationsrate ist dann durch Gensequenzierung bestimmbar. Liegt diese Mutation jedoch in dem Bereich des Gens, in dem der Primer ansetzt, ist die Amplifikation je nach Anzahl und Lokalisation unmöglich, und das Virus entzieht sich seinen Angaben zufolge der Detektion durch diese Untersuchungsmethode. Somit müssten zwei Eigenschaften gleichzeitig zutreffen, um zu falsch negativen Ergebnissen zu führen. Erstens muss eine Mutation auftreten, und zweitens muss diese im Bereich der Primer liegen.

5.8 Vergleich der pathologisch-anatomischen und histologischen Veränderungen mit den Ergebnissen der PCR

Bei dem Vergleich der pathologisch-anatomischen und den histologischen Ergebnissen mit den Resultaten der PCR zeigten sich folgende Ergebnisse (siehe Tabelle IV, Anhang 1):

Alle Tiere (mit zwei Ausnahmen) mit einer deutlichen Leberschwellung, Läppchenzeichnung und Marmorierung (Lebertypen I und II, n = 38) wiesen Myelozyten-Akkumulationen auf. Bei allen diesen Tieren wurden mit den molekularbiologischen Techniken ALV-J-Genomsequenzen detektiert. Somit wurde gezeigt, dass die Tiere mit Leberveränderungen vom Typ I und II mit hoher Wahrscheinlichkeit an einer Infektion mit der Subgruppe J erkrankt waren.

Bei 12 Tieren des Typs III (n = 19), die sich durch eine geringe Leberschwellung und eine kaum vom Normalbild abweichende Läppchenzeichnung sowie durch viele grau bis grauweiße Herde auszeichneten (Nekrosen), wurden ebenfalls mit den PCR-Untersuchungstechniken positive Ergebnisse erzielt. Histologisch wurde auch bei diesen Tieren zum großen Teil (75%) der Nachweis von Myelozyten-Akkumulationen erbracht. Jedoch wiesen sieben Tiere des Typs III keine ALV-J-spezifische Banden auf. Bei nur zwei von diesen sieben Tieren wurden Myelozyten-Akkumulationen erkannt. Eine Infektion mit ALV-J ist bei dieser Lebertypkategorie möglich, jedoch gibt es auch andere Ursachen für derartige morphologische Veränderungen wie z. B. bakteriell bedingte Hepatitiden.

Acht Tiere der Gruppe OLV ließen histologisch Myelozyten-Akkumulationen erkennen und wiesen in der PCR ALV-J-Genomsequenzen auf. Makroskopisch waren diese Tiere unauffällig. Bei diesen Tieren liegt die Vermutung nahe, dass die Menge der Myelozyten und der Zeitraum seit Beginn der Infektion noch zu keinen makroskopischen Veränderungen geführt hat. Auffallend bei diesen Tieren war die hohe Schlachtkörpermasse (Tabelle I, Anhang 1). Payne (1998a) und Stedman und Brown (1999) erbrachten den Beweis, dass Hühner, welche erst nach dem Schlupf infiziert wurden, nur geringe bis gar keine

Massenunterschiede zu nichtinfizierten Tieren aufweisen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass diese acht Hühner horizontal infiziert wurden.

Die makroskopische Beurteilung reicht alleinig zur Diagnose einer ALV-J-Infektion somit nicht aus. Bei einem Verdacht durch die beschriebenen Leberveränderungen sollten demnach weitere Untersuchungsmethoden (Histologie oder PCR) folgen.

Bei den Tiere die dem Grad +++ (Myelozyten-Akkumulationen sind histologisch sofort und in jedem Bildausschnitt auffindbar) und ++ (Myelozyten-Akkumulationen treten im histologischen Bild vereinzelt auf, sind jedoch durch Durchmustern des Schnittes sofort auffindbar) zugeordnet wurden (n = 13), wurde mit drei Ausnahmen durch die PCR ALV-J-Genomsequenzen nachgewiesen. Bei alle Tiere die mit + beurteilt wurden, ließ sich molekularbiologisch ALV-J detektieren. Insgesamt wurde bei 61 Tieren Myelozyten-Akkumulationen nachgewiesen. Bei nur drei dieser Tiere wurde kein positives PCR-Ergebnis erbracht. Somit wiesen 95,08% der Tiere mit Myelozyten-Akkumulationen ALV-J-Genomsequenzen auf. Ein Zusammenhang zwischen Myelozyten-Akkumulationen und einer Infektion mit ALV-J ist somit hoch wahrscheinlich.

Die Diskrepanz zwischen histologisch positiven Ergebnissen und molekularbiologisch negativen Ergebnissen lässt sich durch das Vorkommen von Heterophilen im Rahmen einer Entzündungsreaktion sowie durch Mutationen im Zielbereich der Primer erklären. Die Retroviren gehören zu den Viren, bei denen auf Grund des Fehlens eines Kontrolllese-Mechanismus häufig Mutationen auftreten (Payne 1993a; 1998a; 1998b; 2000a; Smith et al. 1998b; Venugopal et al. 1998).

5.9 Bakteriologische Ergebnisse

Durch bakteriologische Untersuchungen wurden in den untersuchten Proben *Campylobacter jejuni* in 18, coliforme Keime in 43, *Pasteurella* in 28 und *Pseudomonas aeruginosa* in 3 Proben nachgewiesen. *Salmonella* spp. wurden nicht nachgewiesen.

Vor allem die Tatsache, dass mit ALV-J nicht infizierte Tiere dieselben Erreger aufwiesen wie die mit diesem Virus infizierten Tiere und dass diese Tiere dieselben histopathologischen Leberbefunde zeigten, lässt vermuten, dass eine ALV-J-Infektion kein spezieller Wegbereiter für einen der untersuchten Keime ist.

Die Schwächung des Immunsystems durch eingeschränkte Knochenmarks- und Leberfunktionen könnte eine Immunsuppression zur Folge haben und somit eine Prädisposition für eine unspezifische Infektion, nicht aber für einen bestimmten Keim sein. Wie schon gezeigt wurde, stehen jedoch die Aussagen von Stedman et al. (2000) und Shane (2001) dem entgegen. Die hohe Anzahl der bakteriologisch positiven Befunde ist durch die makroskopische Auswahl der untersuchten Tiere erklärbar. Diese am Schlachtband während der Geflügelfleischuntersuchung getroffene Auswahl der Hühner richtete sich nach

Leberveränderungen. Bis auf die 10 Tiere der Gruppe OLV und die 18 Tiere der Lebertypkategorie I (siehe 4.2.1 Leberbefunde) wiesen alle untersuchten Lebern schon makroskopisch Nekrosen auf.

Zu beachten ist, dass alle 10 Kontrolltiere, welche ohne Beanstandung durch die Geflügelfleischuntersuchung liefen, *Campylobacter jejuni* in den Darm- und den Leberproben aufwiesen. Zudem wurden in zwei dieser Proben coliforme Keime nachgewiesen (siehe 4.6 Bakteriologische Ergebnisse).

Die 18 Tiere des Lebertyps I wiesen in einem Fall *Pseudomonas aeruginosa*, in neun Fällen *Pasteurella* spp. und in acht Fällen coliforme Keime auf. Diese Befunde zeigen das breite Keimspektrum der Tiere, welche ausschließlich durch eine Läppchenzeichnung und Schwellung der Leber auffällig wurden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ALV-J wahrscheinlich kein Wegbereiter für eine sekundäre Infektion ist. Weiterhin ist zu bedenken, dass die makroskopischen Symptome, die auf eine ALV-J-Infektion hindeuten, ebenfalls durch eine Infektion mit anderen Erregern hervorgerufen werden können.

5.10 Schlussfolgerungen

Bei der Untersuchung von Jungmasthühnern mit und ohne nachweisbarer ALV-J-Infektion bzw. mit und ohne Leberveränderungen zeigte sich, dass die Körpermasse mit den Leberveränderungen negativ korreliert. Eine verminderte Schlachtkörpermasse, eine Zunahme der Lebermasse und eine geringe Herzmasse kamen häufig in Kombination vor. Ein direkter Zusammenhang mit einer ALV-J-Infektion konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Eine Infektion durch bakterielle Erreger führt offensichtlich zu ähnlichen Befunden.

Bei der pathologisch-anatomischen Bewertung veränderter Lebern wurde festgestellt, dass eine makroskopische Diagnose einer ALV-J-Infektion bzw. der durch sie hervorgerufenen Leberveränderungen nicht mit Sicherheit möglich war. Marmorierung und Schwellung der Lebern mit Abrundung der Leberränder waren verdächtig, aber nicht pathognostisch. Auch die anderen Organe zeigten keine charakteristischen makroskopischen Veränderungen.

Histologisch sind Akkumulationen von Myelozyten in verschiedenen Organen als charakteristisch anzusehen. Sie treten am häufigsten in der Leber, dem Herzen, den Nieren, der Lunge, dem Drüsenmagen, den Nebennieren und dem Dickdarm auf. Differenzialdiagnostisch sind Herde ausdifferenzierter heterophiler Granulozyten als entzündliche Substrate abzugrenzen. Weiterhin können Tumoren anderer Targetzellen (z. B. Fibrosarkome) zum Manifestationsbild der ALV-J-Infektion gehören. Eine Infektion ohne signifikante Myelozyten-Akkumulation ist häufig. Nekrosen, Granulome, Fibrosen und andere Leberveränderungen stehen in keiner erkennbaren Beziehung zum Bild der ALV-J-Infektion.

Mit elektronenmikroskopischen Techniken wurden bei 42 (= 56,76%) der Knochenmarksproben und bei 34 (= 45,95%) der Leberproben Typ-C-Partikel festgestellt. Ihre Zugehörigkeit zur Subgruppe J kann nur auf Grund ihrer Lokalisation in den Myelozyten und unter Berücksichtigung der PCR-Ergebnisse vermutet werden. Der deutlich häufigere Nachweis von Erregern durch die PCR zeigt die höhere Spezifität und Sensitivität dieser Untersuchungsmethode auf.

Der Einsatz von PCR-Techniken zeigt im Untersuchungsmaterial einen überraschend hohen Anteil an infizierten Tieren. Bei 81,08% der untersuchten Tiere konnte eine ALV-J-Genomsequenz detektiert werden. Dieser Wert ähnelt dem Ergebnis der Untersuchung von Fadly und Smith (1999). Diesen Autoren zufolge waren 87% der untersuchten Tiere mit einer Variante von ALV-J infiziert. Comis (1998) hingegen spricht von 40% infizierter Tiere in seinen Untersuchungen.

PCR-Techniken stellen sich derzeit als Mittel der Wahl zur Diagnostik von ALV-J dar. Massenuntersuchungen sind in vergleichbar kurzer Zeit und mit vergleichbar geringem Kostenaufwand durchführbar. Die Ergebnisse sind eindeutig und leicht interpretierbar. Die Methode zeichnet sich durch hohe Sensitivität und Spezifität aus und kann mit vielerlei

Organ- und Sekretmaterial durchgeführt werden können. Falsch negative Ergebnisse sind jedoch möglich und müssen die Weiterentwicklung der Untersuchungsprimer zur Folge haben.

Als sensitivste und spezifischste der drei geprüften Methoden hat sich die nested DNA-PCR erwiesen. Gefolgt im Sinne der Sensitivität und Spezifität wurde diese Methode von der nested RT-PCR.

Im Vergleich der PCR-Ergebnisse mit der Histologie wurde gezeigt, dass die Myelozyten-Akkumulationen Resultate einer ALV-J-Infektion sind. Alle andere pathogenen ALV (mit Ausnahme der endogene Subgruppe E) wurden durch die PCR-Methode nach Smith et al. (1998) ausgeschlossen.

Die bakteriologischen Untersuchungen haben keinen Zusammenhang zwischen ALV-J-Infektionen und bakteriellen Infektionen erkennen lassen. Insbesondere die auffälligen Leberveränderungen (Granulome, Nekrosen, Blutungen, Bindegewebszubildungen und Gallengangsstauungen) sind ursächlich vermutlich als Resultat einer bakteriellen Infektion oder stoffwechselbedingter Störungen anzusehen.