

Die Milzen der mit dem Adenovirus FAV1 infizierten Jungmasthühner (Positivkontrollen) wiesen unter Einsatz der Lymphozytenmarker **CD3** (Dako), **CD3** (Biozol), **IgM** und **IgG** deutlich oberflächengefärbte Lymphozyten auf. Die Negativkontrollen der durchgeführten Färbungen zeigten keinerlei spezifische oder unspezifische Färbungen.

3.3.7.2 Identifizierung von Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS)

In den Lymphozytenansammlungen der neoplastisch veränderten Hühnerhaut wurden mit Hilfe der ANAE-Technik zahlreiche **Makrophagen** nachgewiesen. Das Zytoplasma der Makrophagen färbte sich intensiv rotbraun an. Ihr Anteil an den Entzündungszellen betrug maximal **20 Prozent**. Sie fanden sich sowohl im Zentrum als auch peripher der lymphozytären Ansammlungen. Einige Makrophagen traten, ähnlich wie die freien Lymphozyten, einzeln im Binde- und Fettgewebe auf.

In der Hundehaut (Positivkontrolle) färbten sich die Makrophagen ebenfalls rotbraun an. Die Negativkontrollen der durchgeführten Färbungen waren negativ und zeigten keinerlei spezifische oder unspezifische Färbungen.

In Tabelle XVI ist der maximale Anteil von Lymphozytenfraktionen, Plasmazellen und Makrophagen an den entzündlichen Infiltraten dargestellt. Da der Anteil an Makrophagen etwa 20% betrug, stellten etwa **80%** der entzündlichen Infiltrate **Lymphozyten und Plasmazellen** dar. Wie bereits erwähnt, betrug der Anteil von B- und T-Zellen an der Lymphozytenfraktion etwa 25 bzw. 75 Prozent.

Tabelle XVI: Maximaler Anteil von Lymphozytenfraktionen, Plasmazellen und Makrophagen an den entzündlichen Infiltraten

Entzündungszellen	Maximaler Anteil an entzündlichen Infiltraten [%]
T-Lymphozyten	60
B-Lymphozyten	17
Plasmazellen	3
Makrophagen	20

3.3.8 Untersuchungen zur ätiologischen Beteiligung von Viren

3.3.8.1 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Viruspartikeln

Im Rahmen der ultrastrukturellen Charakterisierung der Hautveränderungen wurden in sechs der 26 tumorös veränderten Hautproben, das entspricht etwa 23%, elektronenmikroskopisch virusähnliche Partikel nachgewiesen (Abb.24). In einer der neun untersuchten unveränderten Hautproben traten diese Partikel ebenfalls auf.

Die Viruspartikel erschienen rund bis oval und besaßen Durchmesser zwischen 100 und 135 nm. Sie enthielten ein elektronendichtes hexagonales Nukleokapsid, dessen Durchmesser etwa 40 nm betrug. Auf ihrer Virushülle (Envelope) fanden sich zahlreiche knopf- und stielförmige Erhebungen. Die Viren fanden sich entweder im Interzellularraum zwischen weniger differenzierten Geschwulstzellen oder innerhalb dieser in Zytoplasmavakuolen. Einzelne Viruspartikel wurden auch im Bereich des Bindegewebes nachgewiesen, wobei sie hier bevorzugt extrazellulär auftraten.

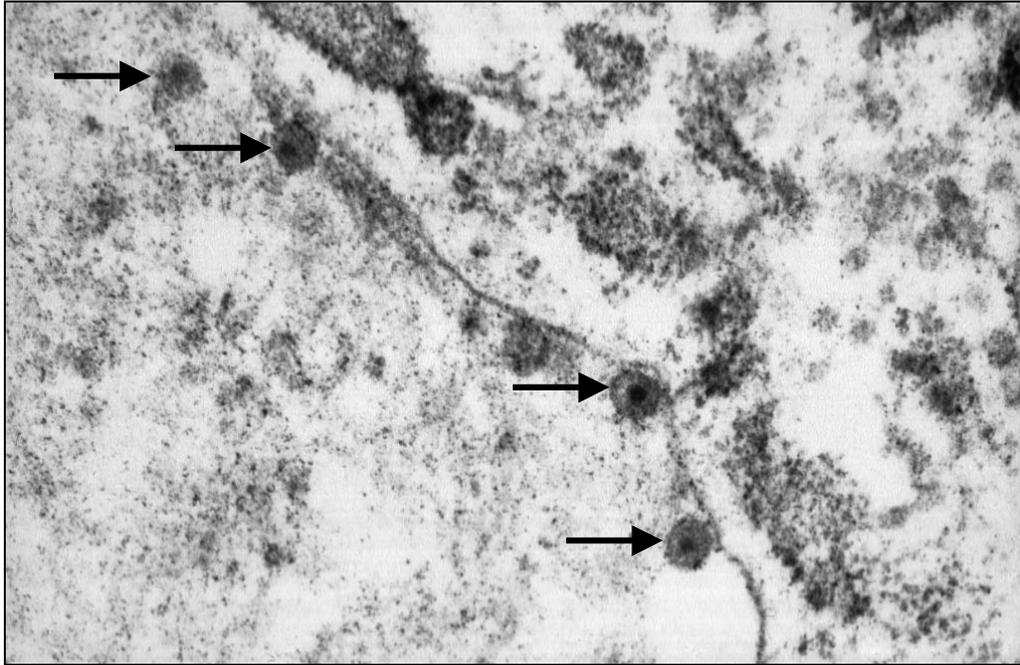


Abb. 24: Virusähnliche Partikel (—————>) an der Zellmembran eines Keratinozyten.
TEM-Präparat, (Vergrößerung: 60.000)

Zahlreiche dieser virusähnlichen Partikel standen mit der Zellmembran der Geschwulstzellen in engem Kontakt, was auf „budding“-Prozesse hindeutet (Abb.24). Hierbei handelt es sich um einen Vorgang der Virusreifung, bei dem das Virus beim Durchtritt durch die zellige Membranen eine Lipidhülle erhält, welche durch den Einbau von Antigenen virusspezifisch verändert wird.

Morphologisch besaßen die Viruspartikel große Ähnlichkeit mit den Typ C-Onkoviren der Hühner (Abb.25).

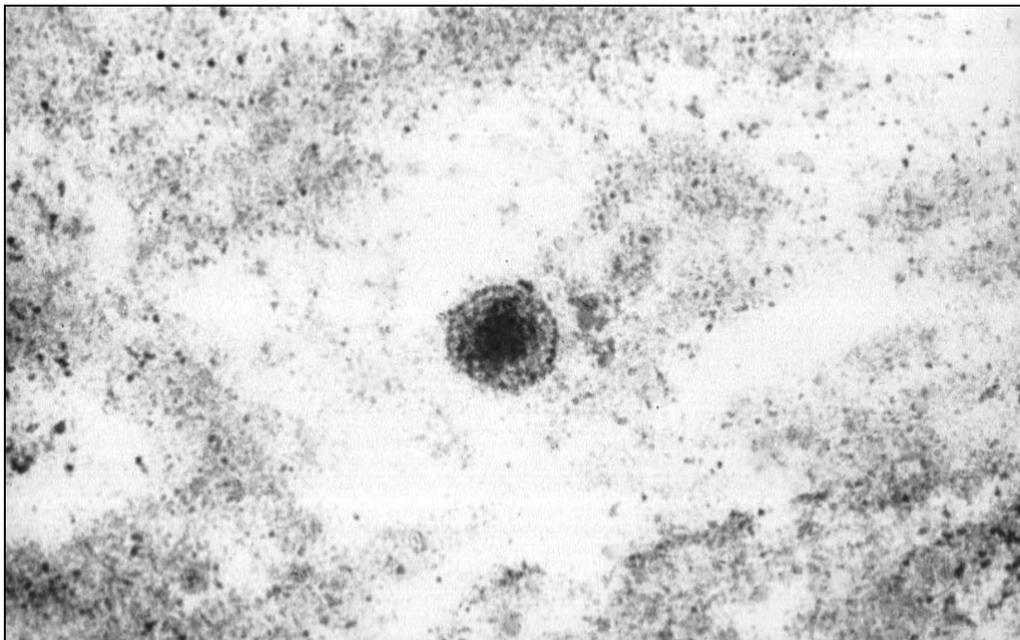


Abb. 25: Elektronenmikroskopische Darstellung eines virusähnlichen Partikels in der neoplastisch veränderten Hühnerhaut.
TEM-Präparat, (Vergrößerung: 103.200)

3.3.8.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zum Nachweis von Virus- core-Protein p27 und Antikörpern gegen ALV-A, B, J und REV

Nachweis des Virus-core-Proteins p27

Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Viruspartikel nachgewiesen, die morphologisch den Erregern der aviären Onkovirosen der Hühner ähnelten. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde ein Antigen-ELISA durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es, das Virus-core-Protein **p27** nachzuweisen, das aviäre Leukoseviren aller Subtypen und endogene Viren besitzen.

Die Ergebnisse des IDEXX-ELISA wurden in einem S/P- (sample/ positiv control-) ratio angegeben. Die Proben wurden Leukoseantigen-negativ bewertet, wenn der S/P-ratio gleich oder kleiner 0,2 war. War der S/P- ratio größer 0,2 , wurden die Proben positiv bewertet.

In den neoplastisch veränderten Hautproben, die in vier Pools a` drei Proben untersucht wurden, verlief der Nachweis des Core-Proteins p27 deutlich positiv: Der S/P-ratio ergab Werte zwischen 0,56 und 0,84 (siehe Tabelle XVII). Zwei der vier untersuchten Kloakentupferproben sowie 60 Prozent der gesunden Hautproben reagierten ebenfalls p27-positiv. Auch in vier (36,4%) der elf untersuchten Vollblutproben wurde das Core-Protein p27 gefunden. Dies bestätigt die Anwesenheit von aviären Leukoseviren in diesen Proben.

In Tabelle XVII sind diese Ergebnisse noch einmal in der Übersicht dargestellt.

Tabelle XVII: Ergebnisse des Antigennachweises im ELISA

Art der Probe	Probennummer	S / P-ratio	Bewertung
neoplastisch veränderte Hautproben	Pool 1	0,84	positiv
	Pool 2	0,56	positiv
	Pool 3	0,77	positiv
	Pool 4	0,62	positiv
Kloakentupfer betroffener Hühner	1	0,63	positiv
	2	0,03	negativ
	3	0,64	positiv
	4	0,05	negativ
unveränderte Hautproben	1	0,24	positiv
	2	0,30	positiv
	3	0,02	negativ
	4	0,27	positiv
	5	0,02	negativ
Vollblutproben gesunder Hühner	1	0,09	negativ
	2	0,10	negativ
	3	1,15	positiv
	4	0,15	negativ
	5	0,09	negativ
	6	0,10	negativ
	7	0,19	negativ
	8	0,12	negativ
	9	0,50	positiv
	10	0,34	positiv
	11	0,37	positiv

Antikörpernachweis

Nachdem der Nachweis des Core-Proteins p27 in verschiedenen Gewebeproben gelungen war, bestand großes Interesse zu erfahren, um welche **Leukosevirusuntergruppe** es sich bei den nachgewiesenen Viren handelte. Die Untergruppenbestimmung sollte mit Hilfe eines Antikörpernachweises im ELISA an Vollblutproben von Jungmasthühnern erfolgen, welche aus Herden mit Hautkarzinomatose stammten.

Die Ergebnisberechnung erfolgte wie für die Virusantigenbestimmung beschrieben: Die Proben wurden negativ bewertet, wenn der S/P-ratio gleich oder kleiner 0,6 war. War der S/P-ratio größer 0,6, wurden die Proben positiv bewertet.

In allen untersuchten Blutproben lieferte der ELISA zum Antikörpernachweis aviärer Leukoseviren der Untergruppen A, B und J sowie von REV ein S/P-ratio kleiner 0,6. Demnach waren Antikörper gegen die genannten Virusgruppen in keiner der untersuchten Blutproben zu finden. Eine Untergruppenbestimmung der Leukoseviren, auf die die positiven Ergebnisse im p27-ELISA hinweisen, gelang demnach nicht. Tabelle XVIII zeigt die Ergebnisse der Antikörperbestimmung für die Untergruppen A, B (ELISA LL-Ab), J (ELISA ALV-J) und für Retikuloendothelioseviren (ELISA REV) in der Übersicht.

Tabelle XVIII: Ergebnisse der Antikörpernachweise für die Leukosevirusuntergruppen A, B (ELISA LL-Ab), J (ELISA ALV-J) und für Retikuloendothelioseviren (ELISA REV)

ELISA-Virus-Antikörpernachweis	Probennummer (Vollblutproben)	S / P-ratio	Bewertung
ELISA LL-Ab	1	0,00	negativ
	2	0,02	negativ
	3	0,01	negativ
	4	0,01	negativ
	5	0,01	negativ
	6	0,01	negativ
	7	0,00	negativ
	8	0,01	negativ
	9	0,01	negativ
	10	0,01	negativ
	11	0,00	negativ
ELISA ALV-J	1	0,06	negativ
	2	0,07	negativ
	3	0,07	negativ
	4	0,07	negativ
	5	0,06	negativ
	6	0,07	negativ
	7	0,07	negativ
	8	0,07	negativ
	9	0,06	negativ
	10	0,08	negativ
	11	0,08	negativ
ELISA REV	1	0,00	negativ
	2	0,00	negativ
	3	0,00	negativ
	4	0,00	negativ
	5	0,00	negativ
	6	0,05	negativ
	7	0,00	negativ
	8	0,01	negativ
	9	0,03	negativ
	10	0,00	negativ
	11	0,09	negativ