### Gallenpigmentablagerung

Es wurde in einer Leber lichtmikroskopisch der Nachweis von Gallenpigment in den Gallengangsepithelien, den Disseschen Räumen, den Kupfferschen Sternzellen und den Hepatozyten geführt. Es handelte sich um jenes Tier, welches makroskopisch den Typ VI darstellte.

### Gallengangsproliferation

Vermehrte Gallengangsproliferation konnte bei 12 Tieren der Gruppe LV gezeigt werden. Als "Gallengangsproliferation" wurde eine über der Norm liegende Anzahl von Gallengangslängs- und -querschnitten bezeichnet, die insbesondere in den Glissonschen Dreiecken auftraten. Diese Einteilung erfolgte semiquantitativ.

### Blutungen

In 22 Fällen wurde Blut im Lebergewebe außerhalb der Gefäße histologisch sichtbar. Die Tiere stammten alle aus der Gruppe LV und wiesen Nekrosen, Bindegewebszubildungen und Entzündungserscheinungen auf.

### Verfettung

Eine großtropfige Leberzellverfettung wurde bei 8 Tieren der Gruppe LV gesichtet. Die Verfettungen waren peripherolobulär lokalisiert.

### Perihepatitis

Eine Perihepatitis fibrosa wurde bei 6 Lebern aus der Gruppe LV histologisch nachgewiesen. Es handelte sich um dieselben Lebern, bei denen makroskopisch schon eine Verklebung der serösen Häute auffällig wurde.

### Fibrosarkome

Fibrosarkome wurden bei 2 Tieren festgestellt. Das entartete Bindegewebe wuchs infiltrativ. Mitosestadien waren häufig, und das umliegende Lebergewebe wurde durch den Tumor zurückgedrängt. Dabei unterlagen die Leberzellen einer Druckatrophie.



Abbildung 18: Grafische Darstellung der histologischen Veränderungen von 74 untersuchten Hühnerlebern

### 4.3.1.3 Sonstige Organe

Außer den Nachweisen von Myelozyten (siehe 4.3.1) wurden lichtmikroskopisch noch folgende Veränderungen ermittelt:

**Herz**: heterophile, granulozytäre Infiltration in 38, lymphozytäre Infiltration in 10, Hyperkontraktion der Muskelzellen in drei, eitrig-abszedierende Endokarditis in zwei Fällen sowie serös-eitrige Perikarditis und Epikarditis in jeweils einem Fall.

**Lunge**: interstitielle Pneumonie in 12 Fällen, katarrhalisch-eitrige Bronchitis in vier Fällen, katarrhalisch-eitrige Parabronchitis in drei Fällen, Fibrosarkom in einem Fall.

**Knochenmark**: Proliferation der myeloischen Entwicklungsreihe bei 18 Proben aus dem Femurknochenmark. Alle Tiere stammten aus der Gruppe LV (n=31).

**Drüsenmagen**: heterophile, granulozytäre Infiltration in einem Fall, erosive, katarrhalische Gastritis des Drüsenmagens in einem weiteren.

**Dünndarm**: Kokzidien in 20 Fällen, Cryptosporidien in einem Fall, Jejunitis in sechs Fällen, heterophile, granulozytäre Infiltration in zwei Fällen.

Dickdarm: Blutung in einem Fall, heterophile, granulozytäre Infiltration in einem Fall.

Trachea: heterophile, granulozytäre Infiltration in zwei Fällen.

Milz: heterophile, granulozytäre Infiltration in einem Fall.

**Nieren**: Kernpyknose im Tubulusepithel in einem Fall, heterophile, granulozytäre Infiltration in einem Fall.

Nebennieren: heterophile, granulozytäre Infiltration und Fibrosarkom in je einem Fall.

Die untersuchten Proben folgender Organe wiesen keine Besonderheiten auf: **Thymus**, **Bursa Fabricii, Kropf** und **Nervus ischiadicus**.

### 4.4 Elektronenmikroskopische Untersuchung

### 4.4.1 Dünnschnitttechnik

Elektronenmikroskopisch wurden Ultradünnschnitte der Leber und des Knochenmarkes in einer 7.000 bis 30.000fachen Vergrößerung untersucht. Es wurden nur diejenigen Proben ausgewertet, welche mit der DNA-PCR Amplifikate von ALV-J zeigten. Zur Vorbereitung wurden Semidünnschnitte angefertigt, um die geeigneten Areale (Myelozyten-Akkumulationen) für die Ultradünnschnitte zu bestimmen. Ein solches Areal zeigt Abbildung 19.



Abbildung 19: Semidünnschnitt einer Leber mit Myelozyten im Leberparenchym (gefärbt mit Toluidinblaulösung, 600fache Vergrößerung)

Die elektronenmikroskopische Untersuchung war speziell auf das Vorkommen von Typ-C-Partikeln ausgerichtet. Diese stellen sich nach Murphy et al. (1999) elektronenmikroskopisch wie folgt dar: Es handelt sich um behüllte Viren, welche einen Durchmesser von 80-100 nm aufweisen. Sie zeigen eine charakteristische, dreischichtige Struktur. Innenliegend befindet sich ein helikal symmetrischer Genom-Nukleoprotein-Komplex, welcher von der einsträngigen RNA, der reversen Transkriptase, der Protease, der Integrase und den Nukleoproteinen gebildet wird. Ein ikosaedrisches Kapsid umgibt diesen Komplex. Die Größe des Kapsids beträgt ca. 60 nm. Umhüllt ist das Virus von einer Membran, welche von der Wirtszelle abstammt. Diese Hülle erwirbt das Virus beim "Budding" (Ausstülpungsprozess aus der Wirtszelle). Ein solches Virus zeigt Abbildung 20.



Abbildung 20: Schematisiertes Retrovirus vom Typ C modifiziert nach Murphy et al. (1999) Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass sich in den Myelozyten virale Strukturen befanden, welche morphologisch den Retroviren entsprachen.

In der Dünnschnitttechnik erwiesen sich die in dieser Studie gefundenen Partikel rund bis oval. Ihr Durchmesser betrug ca. 90 bis 110 nm. Eine innenliegende Struktur erschien ikosaedrisch. Der Innenkörper dieser Strukturen war entweder elektronendicht oder –durchlässig. Die einschichtigen Virushüllen erschienen glatt. Derartige Strukturen wurden im Zytoplasma von Myelozyten detektiert. Ein Budding wurde in keinem der untersuchten Proben entdeckt, daher konnten diese Strukturen nicht eindeutig als Retroviren klassifiziert werden. Derartige Partikel zeigen Abbildung 21 und Abbildung 22.



Abbildung 21: Die Pfeile deuten auf retrovirusähnliche Partikel mit einer Größe von ca. 100 nm in einem Myelozyten aus dem Knochenmark (7.000fache Vergrößerung)



Abbildung 22: Retrovirusähnliche Partikel in einem Myelozyten (Knochenmark, 30.000fache Vergrößerung)

### 4.4.2 Negativkontrasttechnik

Mit der Negativkontrasttechnik wurden Proben von Leber, Knochenmark und Darminhalt aller

74 Tiere untersucht. Die Ergebnisse werden in Tabelle 8 wiedergegeben.

Bei der Untersuchung der negativkontrastierten Proben wurden sowohl im Knochenmark als auch in der Leber Strukturen gefunden, die in der Morphologie den Retroviren gleich sind (

Abbildung 23). Diese Partikel erschienen rund, ihr Durchmesser betrug 80-100 nm, und das Core erschien ikosaedrisch. Die nach außen gerichtete Seite der zweischichtigen Virushülle erwies sich als uneben.

	Knochenmark	Darminhalt	Leber
<b>Gruppe LV</b> (n = 64)	43 mal retrovirusähnliche Partikel	dreimal Rota- virus	34 mal retro- virusähnliche Partikel
Gruppe OLV (n=	einmal Partikel	Rotavirus	keine Partikel

 Tabelle 8: Untersuchungsergebnisse der negativkontrastierten Proben



Abbildung 23: Partikel mit der Morphologie von Retroviren in einer negativkontrastierter Leberprobe (50.000fache Vergrößerung) Insgesamt wurden mit der Negativkontrasttechnik in 44 Knochenmarkspräparaten (43 Proben aus der Gruppe LV und 1 Probe aus der Gruppe OLV) und in 34 Leberpräparaten (Gruppe LV) retrovirusähnliche Strukturen gefunden. Zwei Mal wurden in Knochenmarkspräparaten und ein Mal in Leberpräparaten Strukturen gesehen, welche an Viruspartikel denken ließen, es konnte jedoch keine Zuordnung nachvollzogen werden.

Im Vergleich mit den PCR-Ergebnissen (siehe Kapitel 4.5 Molekularbiologische Untersuchung) ließen sich folgenden Aussagen treffen:

In sieben Fällen wurden nur in den Leberpräparaten virusähnliche Partikel erkannt. Die PCR wies bei diesen Tieren ALV-J-Genomsequenzen nach.

14 Tiere, bei denen die PCR Amplifikate zeigte, ließen virusähnliche Partikel ausschließlich in den Knochenmarkspräparaten erkennen.

Vier Tiere zeigten weder positive Ergebnisse in der PCR noch in der Negativkontrasttechnik.

Ein Tier, welches molekularbiologisch positive Amplifikate aufwies, zeigte in den Knochenmarkspräparaten virusähnliche Partikel, welche nicht einzuordnen waren. Die Leberpräparate dieses Tieres wiesen keine Besonderheiten auf.

18 Tiere zeigten in der PCR positive Ergebnisse, elektronenmikroskopisch wurde jedoch kein Virusfund erhoben.

Bei sechs Tieren wurden sowohl in den Leber- als auch in den Knochenmarkspräparaten retrovirusähnliche Strukturen erkannt, molekularbiologisch war jedoch kein Nachweis von ALV-J Genomsequenzen zu erbringen.

Ein Tier zeigte in der PCR unklare Ergebnisse. Bei diesem Tier waren Leber und Knochenmark in der Negativkontrasttechnik negativ.

Ein Tier zeigte in den Leber- und den Knochenmarkspräparaten virusähnliches Material, welches nicht in die bekannten Klassen einzugruppieren war.

Die Ergebnisse des Vergleichs mit den PCR-Befunden können in der Tabelle III (Anhang 1) nachvollzogen werden.

### 4.5 Molekularbiologische Untersuchung

Auf das Vorhandensein von Sequenzen des ALV-J Genoms wurden Proben der Gruppe OLV und der Gruppe LV z. T. mehrfach mit PCR-Techniken untersucht (siehe Tabelle IV, Anhang 1).

Die Extraktion der DNA erfolgte mit dem DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen<sup>®</sup> nach Herstellervorschriften. Es wurden 0,5 g Leberprobe 120 Minuten lysiert und die DNA mit 200 µl AE-Puffer zweifach eluiert.

### 4.5.1 Referenzmaterial

Als Referenzprobe wurde eine Mastelterntierhenne, welche alle Anzeichen einer AML aufwies, gewählt. Eine DNA-PCR von Smith et al. (1998) mit den Primern H5 und H7 (neuere Isolate der Subgruppe J) wurde mit Lebermaterial dieses Huhnes durchgeführt. Anschließend folgte die Sequenzierung des gewonnenen Materials. Das Ergebnis zeigte, dass die amplifizierte Gensequenz des Huhnes zu 97% mit der aus der Literatur bekannten Sequenz von HPRS-103 (Z46390) übereinstimmt.

Dasselbe Tier wurde noch mit der Methode von Pham et al. (1999) molekularbiologisch auf das Vorhandensein anderer Subgruppen der ALV (A bis E) untersucht. Außer der Subgruppe E wurden keine Gensequenzen detektiert.

Somit wurde das Material dieses Tieres für die hier beschriebenen Untersuchungen als Referenz für die Gensequenz von neueren Isolaten der Subgruppe J gewählt. Die Sequenzen sind im Anhang 2 tabellarisch aufgeführt.

### 4.5.2 DNA-PCR

Die PCR erfolgte nach der Methode von Smith et al. (1998). Der H5-Primer wurde als Plusprimer und der H2-Primer als Minusprimer zur Amplifikation von Gensequenzen des Prototyps HPRS-103 verwendet. Um Nukleinsäuren von neueren Isolaten zu amplifizieren, wurde derselbe Plusprimer mit H7 als Minusprimer genutzt. Zur Untersuchung, ob Infektionen mit den Subgruppen A-E vorliegen, wurde der Minusprimer ADI mit dem genannten Plusprimer kombiniert.

Mit der Kombination H5 und H7 wurden insgesamt 35 der 74 Lebern untersucht. 15 dieser Proben zeigten positive Reaktionen, 19 zeigten negative Reaktionen und 1 Probe zeigte nicht auswertbare Ergebnisse (Mehrfachbanden).

Ein Bild der Ergebnisse zeigt Abbildung 24. Die Spur 1 enthält die Markersubstanz, Spur 2 die Negativkontrolle, die Spuren 3 bis 7 unterschiedliche Elutionsproben der Leber 39 zum Nachweis von ALV-J, die Spuren 8 bis 11 den PCR-Nachweis von ALV A-E (ebenfalls in unterschiedlichen Elutionsproben) der Leber 39. Die Spur 12 zeigt die Referenzprobe.



Abbildung 24: Polaroidfoto einer DNA-PCR zum Nachweis von ALV-J und ALV A-E

### 4.5.3 nested DNA-PCR

Zur Verbesserung der Sensitivität und der Spezifität der Ergebnisse wurde an die Methode von Smith et al. (1998) eine nested PCR angeschlossen. Ein Bild der Ergebnisse zeigt Abbildung 25 Hier wird in der Spur 1 der Marker sichtbar, Spur 2 zeigt die Negativkontrolle, die Spuren 3-12 geben das Ergebnis der Untersuchungen der Proben 1, 2, 4, 5 und 6 jeweils in der ersten und zweiten Elution wieder. Die Spur 13 zeigt das Ergebnis der PCR von der Referenzprobe.

Mit dieser Methode wurden 72 Tiere untersucht. 58 Proben (50 Tiere der Gruppe LV und 8 Tiere der Gruppe OLV) wiesen Amplifikate auf, 13 Proben waren negativ. Zwei dieser negativen Proben stammten aus der Gruppe OLV. Ein Ergebnis war nicht auswertbar (Mehrfachbanden, dieses Tier wurde nicht mit der DNA-PCR untersucht). Bei zwei Tieren der Gruppe LV wurde keine nested DNA-PCR angewandt.

Im Vergleich mit der vorangegangenen DNA-PCR ergeben sich 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 mit negativen Ergebnissen bei dieser Methode zeigten in der vorangegangenen DNA-PCR ebenfalls keine Amplifikate.
- Alle Proben, die in der DNA-PCR positiv getestet wurden, zeigten auch in der nested DNA-PCR eine spezifische Bande.
- Die Probe, die in der DNA-PCR nicht auswertbar war, fiel in der nested DNA-PCR positiv aus.



Abbildung 25: Polaroidfoto einer nested DNA-PCR zum Nachweis von ALV-J.

### 4.5.4 Verdünnungsreihe der DNA-PCR und nested DNA-PCR

Um die Sensitivität der nested DNA-PCR zu überprüfen und um zu erfahren, um wie viel sensitiver diese Form der PCR gegenüber der in der Literatur beschriebenen Form ist, wurde eine Verdünnungsreihe mit Probenmaterial des Referenztieres durchgeführt.

Als Ergebnis wurden bei der DNA-PCR noch Amplifikate bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-4</sup> deutlich (Abbildung 26). Die Spuren weisen folgende Amplifikate auf: Spur 1 Marker, Spuren 2 und 8 ursprüngliche Probe, Spur 3 bis 7 verdünntes Material der ersten Elution von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup>, Spuren 9-13 verdünntes Material der zweiten Elution von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup>.



Abbildung 26: Polaroidfoto der DNA-PCR-Verdünnungsreihe

Die Auswertung der nested DNA-PCR zeigte noch bis zu einer Verdünnung von 10<sup>-8</sup> Banden im Polaroidfoto (Abbildung 27). Die Spuren zeigen folgendes: Spur 1 Marker, Spur 2 Negativkontrolle, Spur 3 Positivkontrolle, Spur 4 bis 13 verdünntes Material von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-10</sup>, Spur 14 Marker.



Abbildung 27: Polaroidfoto der nested DNA-PCR-Verdünnungsreihe

Anhand dieser Ergebnisse wurde gezeigt, dass die nested DNA-PCR um den Faktor 10<sup>4</sup> sensitiver ist als die in der Literatur beschriebene DNA-PCR zum Nachweis von ALV-J.

### 4.5.5 Nested RT-PCR (RNA-PCR)

Die RT-PCR wurde mit einem "one-step System" von Qiagen®, gefolgt von einer nested RT-PCR und analog der für den DNA-Nachweis beschriebenen, durchgeführt. Es kamen nur ausgewählte Proben zur Untersuchung. Die Kriterien waren durch die vorangegangenen PCRs gegeben. So wurden nur Proben untersucht, welche in der nested DNA-PCR negative Ergebnisse erzielten oder bei wiederholten Untersuchungen keine eindeutigen Banden zeigten.

Es wurden insgesamt 17 Tiere mit diesem System untersucht. Die Proben zeigten gegenüber der nested DNA-PCR (DNA-Nachweis) abweichende Ergebnisse, indem die nested RT-PCR (RNA-Nachweis) bei 4 Tieren Amplifikate zeigte, die in der nested DNA-PCR negativ ausfielen. Bei 5 Tieren waren die Ergebnisse insofern gleich, als dass beide Untersuchungsmethoden negative Ergebnisse aufwiesen. Sieben Mal wiesen beide Systeme Amplifikate auf. Das Tier, welches in der nested DNA-PCR nicht auswertbare Ergebnisse lieferte, zeigte auch mit dieser Methode unklare Banden.

#### 4.5.6 Sequenzierung

Um die Ergebnisse zu sichern, wurden Sequenzierungen der PCR-Produkte von einigen Proben und der Mastelterntierhenne durchgeführt. Diese wurden mit den Sequenzen des Prototyps HPRS-103 (Z46390) verglichen. Im Anhang 2 sind die Sequenzvergleiche von HPRS-103 sowie die Sequenzprodukte der DNA-PCR der Mastelterntierhenne und der Tiere 39 und 42 sowie die Sequenzprodukte der nested DNA-PCR der Tiere 7, 8, 11, 12, 13, 26, 32, 34, 40 und 47 tabellarisch aufgeführt.

Die Homologie der Basenpaarsequenzen (bp-Homologie) von der Referenz und der Mastelterntierhenne betrug 97%, die Homologie zur Probe 39 und 42 betrug 92%.

Nach der nested DNA-PCR erfolgte eine weitere Sequenzierung der PCR-Produkte. Es wurde die Referenz mit den Proben der Mastelterntierhenne, der Proben 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 26, 32, 34, 40, 51, 59 (Gruppe LV) sowie 2 Tiere der Gruppe OLV untersucht.

Homologien von 95 bis 97% der DNA-Sequenzen von der Referenz und den Untersuchungsproben wurden festgestellt. Diese bp-Homologien sind im Einzelnen:

Eine Homologie von 95% bestand zwischen der Referenz und den Proben 9, 40 und dem 6 Tier der Gruppe OLV.

Eine Homologie von 96% bestand zwischen der Referenz und den Proben 7, 26, 47 und 51. Eine Homologie von 97% bestand zwischen der Referenz und den Proben 4, 8, 11, 12, 13, 32, 34 und 59 sowie dem 2ten Tier aus der Gruppe OLV.

# 4.5.7 Vergleich der histologischen Funde von Myelozyten in der Leber und den molekularbiologischen Ergebnissen

Bei einem Vergleich der histologischen Ergebnisse in Bezug auf die Myelozytenakkumulationen +, ++, +++ mit den molekularbiologischen Ergebnissen lassen sich folgende Aussagen treffen. Als molekularbiologisch positives Ergebnis galten alle Proben, welche in einer der Untersuchungstechniken eindeutige Banden nach einer der PCR zeigten. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 28.



Abbildung 28: Vergleich der lichtmikroskopischen und molekularbiologischen Ergebnisse Eine Übereinstimmung zwischen + und den PCR-Ergebnissen lag bei 27 Tieren vor (96%). Ein Tier, welches lichtoptisch mit + beurteilt wurde, zeigte in der nested DNA-PCR und in der nested RT-PCR Mehrfachbanden (4%).

Eine Übereinstimmung zwischen ++ und den PCR-Ergebnissen erwies sich bei 18 Tieren (90%). Zwei der histologisch mit ++ bewerteten Tiere zeigten in der PCR keine Bande (10%). Eine Gleichheit der Ergebnisse zwischen den Tieren, welche +++ beurteilt wurden, mit der Molekularbiologie war in 12 Fällen gegeben (92%). Ein Tier dieser histologischen Einteilung zeigte mit den molekularbiologischen Techniken keine Amplifikate (8%).

Neun der histologisch negativen Tiere wiesen auch molekularbiologisch keine Amplifikate auf (69%). Vier der Tiere aus dieser histologischen Einteilung zeigten nach der Gelelektrophorese spezifische Banden (31%).

### 4.5.8 Nachweis der Subgruppen A-E

Um das Vorhandensein der Subgruppen A-E zu detektieren, wurde die Methode von Smith et al. (1999) modifiziert. Als Plusprimer diente H5, als Minusprimer wurde der Primer ADI gewählt.

Parallel zu diesem System wurde die Methode von Pham et al. (1999) angewandt, um zwischen den einzelnen Subgruppen zu differenzieren.

Die Methode von Smith erwies sich als sensitiver. Bei allen untersuchten Proben wurden Amplifikate und somit der Nachweis für eine dieser Subgruppen erzielt.

Die Methode von Pham mit Primern für die einzelnen Subgruppen (A-E) erlaubte eine Differenzierung und zeigte, dass ausschließlich mit den Primern der Subgruppe E Amplifikate nachgewiesen wurden. Somit wurde gezeigt, dass in den Proben ausschließlich die Subgruppe E vorhanden war.

### 9 Anhang 1

 Tabelle I:
 Massen der Schlachtkörper und der untersuchten Organe von 74 Hühnern

Tier-	Schlacht-	Masse der	Masse	Masse der re.	Masse der	Masse des	Masse des	Masse des	Masse des	Masse der
nummer	körpermasse	Leber	der Milz	Niere	li. Niere	Herzens	Drüsenmagens	Muskelmagens	Darmkonvolutes	Bursa
1	986,2	45	1,6	5,3	5,5	9,9	9,5	24,1	88,4	0,8
2	890,6	63,5	1,8	4,5	5,9	7,1	5,7	n.u.	70,4	0,8
3	800,4	44,2	0,7	4,4	4,6	6,8	4,7	26,4	66,8	5
4	767,3	46,7	1,9	5,2	6	8,3	5,3	23,9	82,3	1,1
5	875,1	47,9	2	6,3	6,2	5,4	7,6	32	86	1,2
6	1111,6	51,6	0,6	5,8	5,3	10	6	311,4	57,4	1,4
7	962,5	35,9	1,9	5,5	5,6	10,2	6,2	37,6	101,5	0,6
8	612,8	35,1	0,8	5,7	5,2	7,7	7,2	33,4	59,8	0,3
9	700.2	31.2	1.9	3.7	4.9	7.8	5.8	35.2	91.8	0.6
10	725.9	31	0.6	4.6	4.5	7.7	5	30.4	59.1	0.7
11	478.4	54.5	1.7	4.3	4.6	5	4.9	23.1	63.3	1.3
12	1028.7	55.7	2	57	62	73	67	31.1	88.1	1,0
13	884.4	49.3	27	57	0,2	7.2	59	28	67.2	1,2
14	936.3	31	2,1	72	72	82	83	30.3	77.5	0.5
15	836.8	/01	16	57	61	5.7	4.9	34.4	74	0,5
16	000,0	55.0	1,0	61	6.2	8.3	- <del>1</del> ,5	35.2	74	0,0
17	921,5 9/15	37.0	1,5	5	5.8	6,5	53	35.2	74 74 5	0,5
10	762.7	57,9	1,1	5	5,6	6.2	5,5	30,2	74,3	0,5
10	116.2	52,0	1,7	0,5	0,7	0,2	0,0	34,0	71,0	1,1
19	F10,3	02,0 46 F	1,0	7,0	6	9,7	1,1	33,3	90,3	0,5
20	540	40,5 25.6	1,0	0,0 24	ت, <i>ا</i>	0,1	4,0	∠4,∠ 2E 0	0∠,∠ 70.0	0,9
21		∠0,0 66.0	0,8	ى, I د ە	3	4,3 o	4,5	30,9 20 F	12,2	0,7
22	785,8	66,9	2,1	6,ð	(	8	9,3	38,5	/1,2	1,2
23	/1/,2	42	1,9	3,9	2,9	6,1	6,9	50,2	102,6	1,2
24	919,7	55,9	2,7	6,8	7	9	5,8	39	98	1
25	642,3	29,4	1,9	3,2	2,9	7,8	6,9	33,8	83,2	1,4
26	953,5	61	2,6	5,4	6	10,6	6,1	40,7	67,5	1,3
27	688	46	1,6	4,4	4,7	7,6	5,8	34,3	71,3	1
28	756,2	44,5	2,7	5,8	6	7,4	6,6	28,8	65,3	0,6
29	621,8	47	1,3	4,6	4,5	6,5	5,1	29,3	60,6	1
30	605,5	33,3	1,7	4,2	4,9	5,8	4,9	30,3	78,3	1
31	770	34,7	2,8	6,4	7,2	6,8	8,8	36,5	63,4	0,5
32	936,3	52,4	1,9	4,2	6,4	6,8	4,8	36,8	80,9	n.u.
33	1028,1	58,2	1,2	7	6,8	9,6	5,2	35,5	91,6	0,9
34	1408,7	45,7	1,8	7	7,4	11,6	8,8	45	106,3	1,6
35	1220,8	36,8	1,5	5,3	5,9	10,1	7,6	49,4	83,1	1,2
36	874,3	56,2	1,9	5,7	6,3	7,7	6,4	35	66,3	1
37	702,6	31,8	1,4	5,4	5,4	6,4	7,1	26,4	76,9	0,9
38	875,3	62,9	2,5	5,4	6	8,9	5,9	34,8	80,2	1,1
39	529	30.3	0.9	2.9	4.2	5.9	4.7	18.5	n.u.	0.6
40	998.9	34.1	2,1	6	6	7.2	6.7	35.3	82.4	1.2
41	904.7	45.4	61	6	57	8	63	29.3	64.1	14
42	569.8	45	0.8	16	16.4	53	58	33.9	43	0.9
43	572.5	43.3	24	28	46	7.6	47	23	52.1	0,3
40	759.1	63.5	2,7	45	4.8	7.2	68	36.7	68.5	0,0
45	850.6	33.4	33	5.4	4.2	10.3	5.6	20.2	56.5	1.2
40	0.00,0	44.2	1.2	3,4	4,2	5.7	3,0	23,2	60.1	1,2
40	520 A	44,Z	1,3	5,5	3,5	5,7	4,0	31,0	09, I 59 5	0,8
4/	010.4	02,1 40	1 2 F	0,1 6.1	4,0 5 0	0,0	0,∠ 70	J∠,∠ 22 €	0,00 60 0	0,0
40	313,1 605.4	43	C,2	0,1	5,0	0,0	1,0	J∠,0	03,3 60 F	0,0
49	020,1	31,5	1,7	4,4	5,3	7,1	5,9	20,2	00,0	n.u.
50	592,3	∠U,b	1,2	1,9	∠,b	0,3	3,1	∠⊃,b	51,9	U,6
51	183,9	60,9	1,7	5,0	0,9	7,3	ზ,თ	21,1	03,2 70 7	U,6
52	8/8,8	31,8 20.5	1,7	5,6	0,1	8,9	Ö	31,3	12,1	0,8
53	861,5	33,5	1,5	5,4	5,6	b,4 -7	6,9	35,3	51,9	1
54	809	43,7	1	4,4	3,7	7	5,9	26,4	60,3	1,1
55	462,8	38,4	1	5,3	5,3	4,9	6,8	25,9	113,2	0,5
56	613,3	47,2	1,2	5,7	5,3	8	6,1	28,8	63,3	0,5
57	1195,1	61,2	2,1	6,5	7,8	8,8	6,9	37,8	43,7	0,7
58	478,9	89,5	1,2	5,2	5,7	6	10,4	39,5	59	0,7
59	762,6	45,4	1	5,2	5,9	5,2	5,3	28,2	75,2	0,7
60	784,7	35,1	2	4,5	6	7,1	5,7	24,8	67,1	1
61	707,7	33,4	1,3	4,1	4,7	6,4	4,6	30,9	61	0,9
62	1345,7	45,5	2,2	7,5	7,6	8,2	9,9	47,4	95,6	0,8
63	884,9	39,1	1,8	6,2	6	8,2	7,5	30	72,3	1
64	910,8	51,4	2,5	5,7	5,1	7,7	8,1	35,8	60,2	0,9
K1	1272,4	<u>39,</u> 5	2,4	6,7	5,5	12,4	6,1	51,4	85,3	1
K2	1334,9	39,3	2,4	7,2	7,2	9,1	8,1	37,9	84,6	0,9
K3	1132,4	35,6	2,5	6,2	5,4	8,8	7	34,3	83	1,5
K4	1272	34,2	2,2	6,1	6.5	10,2	7,6	39,4	105,2	1,4
K5	1313.3	31,2	2,3	5,5	4,9	9,2	6,2	50,5	84,8	0,9
K6	1237.5	35	2.1	5.5	5.5	8.6	7.4	36.9	80.2	1.3
K7	1082	37.5	2	5.7	5.4	8.9	6.6	32.6	79.5	1
K8	1163	35.3	1	4.9	54	7.5	67	31.4	75.2	15
K9	1232.2	34.3	13	46	47	91	53	33.7	67.1	0.8
K10	1329.1	387	23	56	51	9.8	9,5 Q	49.2	91.2	14

Legende: **K** = Tiere der Gruppe OLV, **n. u.** = nicht untersucht, Angabe der Werte in Gramm

### 4.6 Bakteriologische Untersuchung

Es wurden 54 Tiere der Gruppe LV und 10 Tiere der Gruppe OLV auf Campylobacter jejuni untersucht. Es wurden Leber-, Blinddarm-, und Nierenproben der Tiere zur Untersuchung entnommen.

Leber- und Blinddarmproben derselben Tiere wurden weiterhin auf das Vorhandensein von Salmonellen geprüft.

Leberproben wurden weiterhin auf das Vorhandensein coliformer Keime hin geprüft. Es wurde keine weitere Differenzierung der Keime vorgenommen.

Auf Pasteurella spp. und Pseudomonas aeruginosa wurden die Leberproben geprüft, welche eine β-Hämolyse auf der Blutagarplatte zeigten.

Die Ergebnisse sind der Tabelle V im Anhang 1 zu entnehmen.

### 4.6.1 Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen

### Untersuchungen auf Campylobacter spp.

Campylobacter jejuni wurde bei 8 Tieren der Gruppe LV und bei den 10 Tieren der Gruppe OLV gefunden. Diese Ergebnisse wurden histologisch durch die Warthin–Starry-Färbung von Darmproben der Tiere bestätigt. Die Stäbchenbakterien stellen sich in dieser Färbemethode dunkelbraun bis schwarz dar, ihre Form war spirillenählich, komma- bis s-förmig.

### Untersuchungen auf Salmonellen

Salmonellen wurden bei keinem der untersuchten Tiere gefunden.

### Untersuchungen auf coliforme Keime.

Coliforme Keime wurden bei 40 Leberproben der Gruppe LV und bei 2 Leberproben der Gruppe OLV gefunden. Eine Differenzierung der Serovare erfolgte nicht.

### Untersuchung auf Pasteurella spp.

Bei den untersuchten Tieren (Leber-, Milz und Darmproben) wurden 28 positive Tiere ermittelt. Von 3 Tieren zeigten die Proben eine  $\beta$ -Hämolyse auf dem Blutagar, die Keime ließen sich aber nicht weiter identifizieren. Die restlichen Proben zeigten keine  $\beta$ -Hämolyse und wurden daher nicht weiter untersucht.

### Untersuchung auf Pseudomonas aeruginosa

Bei 4 Tieren wurde Pseudomonas aeruginosa in den Leberproben bakteriologisch nachgewiesen.

### 4.6.2 Vergleich der bakteriologischen mit den histologischen Befunden

Bei der Auswertung der Befunde zeigte sich, dass die histologischen Befunde mit den bakteriologischen Befunden keine Übereinstimmungen aufwiesen. Alle pathohistologischen Funde waren mit den unterschiedlichsten bakteriologischen Befunden kombiniert.

Als Ausnahme sind zu nennen: das Fibrosarkom, welches zusammen mit den coliformen Keimen auftrat (das zweite Tier, welches histologisch ein Fibrosarkom aufwies, wurde bakteriologisch nicht untersucht) und die Verfettung, die bei den Tieren mit positiven Nachweis für Campylobacter jejuni nicht auftraten.

Die Tabelle 9 verdeutlicht die Ergebnisse, und Abbildung 29 zeigt diese anhand eines Balkendiagramms.

			Bakteriologischer Nachweis				
			Campylobacte r jejuni (n=18)	Salmonella (n=0)	coliforme Keime (n=43)	Pasteurell a spp. (n=28)	Pseudomonas aeruginosa (n=3)
der Tiere mit pathohistologischen Nachweisen in eweiligen bakteriologischen Nachweisgruppe	pe	Myelozyten- Akkumulation	15	0	33	24	2
	eisgrup	Heterophile Granulozyten	9	0	14	31	3
	Nachw	Nekrosen	8	0	13	31	3
	ologischen	Bindegewebs- zubildungen	7	0	14	30	1
	bakteri	Gallengangs- proliferationen	2	0	8	4	0
	ligen	Granulome	2	0	18	17	2
	ewei	Blutungen	2	0	14	10	2
zahl (	der j	Verfettung	0	0	2	3	1
Anz		Fibrosarkom	0	0	1	0	0

### Tabelle 9: Vergleich der histologischen mit den bakteriologischen Befunden



Abbildung 29: Grafik des Vergleiches der histologischen und bakteriologischen Ergebnisse

### 4.6.3 Vergleich der bakteriologischen und makroskopischen Ergebnisse

### Anhand von Tabelle 10 und

Abbildung 30 wird verdeutlicht, dass kein Zusammenhang zwischen den Lebertypkategorien und den bakteriologischen Ergebnissen vorliegt. Alle untersuchten Keime waren unregelmäßig in den Lebertypkategorien verteilt. Hervorzuheben ist an dieser Stelle, dass die Lebern Gruppe OLV neunfach Campylobacter positiv getestet und zweifach positiv auf coliforme Keime getestet wurden.

	Campylobacter jejuni (n=18)	Salmonella (n=0)	coliforme Keime (n=43)	Pasteurella spp. (n=28)	Pseudomonas aeruginosa (n=3)
I	0	0	9	9	1
II	3	0	14	10	1
III	5	0	14	6	1
IV	1	0	3	2	0
V	0	0	0	1	0
VI	0	0	1	0	0
Gruppe OLV	9	0	2	0	0

## Tabelle 10:Vergleich der bakteriologischen Ergebnissen mit den makroskopischen<br/>Lebertypen



Abbildung 30: Grafische Darstellung des Vergleiches von makroskopischen und bakteriologischen Ergebnisse