

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Tiermaterial, Haltungs- und Fütterungsbedingungen

Insgesamt wurden 178 geschlachtete, gebrühte, entfederte und teilweise ausgenommene Jungmasthühner (beiderlei Geschlecht) der Rasse Lohmann Meat B untersucht. Hierbei handelte es sich um Tiere, die in einem Geflügelschlachtbetrieb während der Geflügelfleischuntersuchung auf Grund ihrer Hautveränderungen aussortiert wurden. Die Schlachtung der Jungmasthühner erfolgte am 34. oder 35. Lebenstag. Das Lebendschlachtgewicht betrug 1400 - 1500 Gramm. Die Tiere stammten aus einem Aufzuchtbetrieb mit Bodenhaltung, in dem auf einem Quadratmeter zwischen 22 und 25 Junghühner gehalten wurden.

Weitere Angaben zur Aufzucht:

- Fütterungssystem: Rohrfütterung mit Rundfuttertrögen
- Futter:
  1. Mischfutter, pelletiert (1. bis 14.Tag)
  2. Mischfutter mit geringem Weizenanteil (5-10%), (15. bis 25.Tag)
  3. Weizenfütterung (2-40%), Misch- und Ergänzungsfutter, (ab 25. Tag)
- Wasser: vier Tränkstränge (1296 Nippeltränken mit Auffangschalen)
- Immunprophylaxe: Bestandsimpfungen während der Aufzucht über das Trinkwasser
  - 3x gegen New Castle disease (Stamm La Sota)
  - 2x gegen Infektiöse Bronchitis (Stamm H120)
  - 1x gegen Infektiöse Bursitis (Gumboro disease)
- Beleuchtung: 40 Watt Glühlampen gleichmäßig verteilt (2-3 Watt / m<sup>2</sup>), dimmbar
- Stalltemperaturen:
 

Einstellungstemperatur:	35°C
2. LW:	31°C
3. LW:	29°C
4. LW:	27°C
5. LW:	25°C
34. / 35. Lebenstag:	24°C
- Luftfeuchtigkeit: 55 – 80%

Die untersuchten Tiere stammten aus einem Geflügelschlachtbetrieb, in dem das Auftreten der Hautkarzinomatose bereits seit 1977 registriert wird. Seit 1984 wurde hier eine deutliche Zunahme der betroffenen Jungmasthühner beobachtet. 1991 erreichte die Hautkarzinomatose in diesem Schlachtbetrieb mit 0,22% ihre höchste Prävalenz. Während dieser Zeit traten auch andere Erkrankungen vermehrt auf, so daß die Verwurfsrate insgesamt deutlich anstieg. In den nachfolgenden Jahren ging die Anzahl der Verwürfe kontinuierlich zurück. Jungmasthühner mit Hautkarzinomatose wurde vergleichsweise selten beobachtet.

1997 erfolgte die Probenentnahme in den Monaten Juli, September und Oktober. Während dieser Zeit waren wöchentlich bis zu 20 Tiere von Hautkarzinomatose betroffen. In dem gesamten Jahr wiesen von insgesamt 14,97 Millionen geschlachteten Jungmasthühnern 820 Tiere, das entspricht 0,005%, Veränderungen der Hautkarzinomatose auf.

1999 wurden die Proben in den Monaten Mai, Juni und Oktober entnommen. Die Gesamtschlachtzahl für dieses Jahr betrug 15,66 Millionen Tiere. Hiervon waren 565 Jungmasthühner, das entspricht 0,004%, von der Hautkarzinomatose betroffen.

### 3.1.2 Probenmaterial

In Vorbereitung auf die *histologischen Untersuchungen* erfolgte die Entnahme von insgesamt 430 neoplastisch veränderten Hautarealen. Betroffene Tiere, die nicht unmittelbar nach ihrer Schlachtung untersucht werden konnten, wurden für maximal fünf Tage, einzeln verpackt, im Kühlschrank bei +8°C aufbewahrt. Fünf Tieren wurden neben erkrankter Haut zusätzlich Organmaterial aus Lunge, Leber und Niere entnommen. Für Kontrolluntersuchungen erfolgte bei drei Tieren eine Probenentnahme aus Bereichen der gesunden Haut.

Die *elektronenmikroskopischen Untersuchungen* wurden sowohl an neoplastisch veränderter als auch an gesunder Hühnerhaut durchgeführt. Die Entnahme der Hautproben erfolgte unmittelbar im Anschluß an die Geflügelfleischuntersuchung im Geflügelschlachtbetrieb. Insgesamt wurden für die Elektronenmikroskopie 140 veränderte und zwanzig unveränderte Hautproben entnommen.

Für die *enzym- und immunhistochemischen Untersuchungen* wurden neben 30 neoplastisch veränderten Hautproben, welche bereits histopathologisch untersucht wurden, 65 weitere etwa 10 x 10 x 5 mm (L x B x H) große tumorös veränderte Hautbereiche entnommen.

Für die Kontrolluntersuchungen standen neben dreißig Hautproben von gesunden Jungmasthühnern, Milzproben von mit Adenovirus- (FAV1-) infizierten Jungmasthühnern sowie Tonsillen- und Hautproben von Hunden (Sektionsmaterial des Instituts für Veterinär-Pathologie, Freie Universität Berlin) zur Verfügung.

Für den *Enzym- Immuntest ELISA* (Enzyme linked immunosorbent assay) wurden von Jungmasthühnern, die an Hautkarzinomatose erkrankt waren, zwölf neoplastisch veränderte Hautproben und vier Kloakentupfer entnommen. Zusätzlich wurden bei elf gesunden Tieren aus der selben Herde Blutproben gewonnen. Die Kontrolluntersuchungen erfolgten an jeweils fünf Haut- und Kloakentupferproben von gesunden Jungmasthühnern.

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Makroskopische Untersuchungen

Makroskopisch wurden erfaßt:

- 1- **Formen** der Hautkarzinomatose
- 2- **Anzahl** der Hautveränderungen pro Tierkörper
- 3- **Lokalisation** der Hautveränderungen auf der Körperoberfläche
- 4- **Größe** der Hautveränderungen (**äußerer Durchmesser**)

Zur besseren Veranschaulichung wurden für diese Untersuchungen sämtliche Läsionen eines Tieres in zwei Skizzen eingetragen, welche die dorsalen und ventralen Hautregionen eines Jungmasthuhnes schematisierten.

## **3.2.2 Histopathologische Untersuchungen**

### **3.2.2.1 Probenentnahme und histologische Präparation**

In Vorbereitung auf die histopathologischen Untersuchungen wurden den Jungmasthühnern etwa 10 x 10 x 5 mm (L x B x H) große Haut-, Lungen-, Leber- und Nierenproben entnommen. Die Fixierung der Präparate erfolgte in 4%iger Formalinlösung.

Zwecks Dehydratation des Gewebes wurde dieses in alkoholische Lösungen steigender Konzentrationen verbracht und anschließend in Paraffin eingebettet. Am Schlittenmikrotom (HM 400R, Firma Microm) wurden von jeder Probe drei 3-6 µm dünne Gewebeschnitte gefertigt und auf Objektträger aufgezogen. Von einigen Hautschnitten sind neben Längs- und Querschnitten auch Horizontalschnitte angefertigt worden. Fünfzehn Hautproben wurden vollständig in Serie geschnitten. Nach Trocknung der Schnitte im Brutschrank über Nacht bei 37°C und anschließender Hämatoxylin / Eosin (HE)- Färbung nach EHRlich (ROMEIS 1989), erfolgte abschließend das Eindecken der Präparate.

### **3.2.2.2 Präparatauswertung**

Die Auswertung der 430 gefertigten HE-Präparate erfolgte am Lichtmikroskop bei 32- bis 400- facher Vergrößerung. Das Anfertigen von Quer-, Längs- und Horizontalschnitten ermöglichte eine nahezu dreidimensionale Betrachtung der Geschwulst in der Hühnerhaut.

Für Vergleichsuntersuchungen wurden von der gesunden Hühnerhaut Schnitte gefertigt, die im Anschluß daran HE-gefärbt und lichtmikroskopisch untersucht wurden.

Die fotografische Dokumentation der histologischen Ergebnisse erfolgte am Fotomikroskop „Axioplan“ der Firma Carl Zeiss.

Die histopathologische Charakterisierung der Hautkarzinomatoseformen erfolgte anhand verschiedener Kriterien:

Zunächst wurde ein allgemeiner Überblick über die Probe gegeben, um die Form der Veränderung und die vorhandene Umgebung zu beurteilen. Es wurden die Gestalt der Tumorzellen sowie etwaige Entzündungserscheinungen in der Umgebung der Geschwulst beschrieben. Die Tumorzellkerne wurden auf ihre Größe und Helligkeit, auf Mitosen sowie auf Anzahl und Deutlichkeit der Nukleoli untersucht. Die Verschiebung der Kern- Plasma-Relation wurde beurteilt. Des weiteren erfolgten Angaben zum Wachstumsverhalten dieser Geschwulst. Sämtliche Veränderungen wurden auf Tumorzelleinbrüche in Blut- oder Lymphgefäße untersucht. Metastatische Aktivität wurde anhand von Haut-, Lungen-, Leber- und Nierenproben überprüft. Struktur und Vaskularisation des Bindegewebes wurden ebenfalls beurteilt.

## **3.2.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**

### **3.2.3.1 Probenentnahme und -konservierung**

Die Entnahme der Hautproben für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen erfolgte direkt nach abgeschlossener Geflügelfleischuntersuchung im Schlachthof. Neben der neoplastisch veränderten Haut wurden auch Proben aus der gesunden Hühnerhaut entnommen und in Karnovsky- Lösung fixiert.

### 3.2.3.2 Ultrahistologische Präparation

Insgesamt 160 Hautproben waren für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen vorgesehen. Diese verblieben über Nacht in Karnovsky-Fixationslösung. Am folgenden Tag wurden von jedem fixierten Hautstück maximal sechs ca. 1 qmm große Hautblöckchen gewonnen. Von den kraterförmigen Hautläsionen wurden bevorzugt die Bereiche des Randwalls zur weiteren Untersuchung herangezogen, da frühere Untersuchungen gezeigt hatten, daß die Geschwulstzellen hier vermehrt auftraten.

Nachdem die Präparate dreifach in Cacodylat-Puffer (0,1 M) gespült worden waren, wurden sie für 90 Minuten in ein 1 %iges Osmiumtetroxid-Cacodylatpuffer-Gemisch verbracht. Nach einer sorgfältigen Spülung in Cacodylat- Puffer erfolgte die Entwässerung der Blöckchen in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen. Anschließend wurden die Hautproben in Propylenoxid gespült und in einem Propylenoxid-Agar100-Gemisch über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Hautstückchen in Gefäße mit reinem Agar100-Gemisch umgesetzt. Die Aushärtung der für die Weiterverarbeitung benötigten Kunststoffblöckchen erfolgte über Nacht bei 50°C im Brutschrank. Abschließend wurde der überstehende Kunststoff am Trimmergerät (TM 60, Firma Reichert-Jung) abgetragen. Zur Orientierung dienten am Sakura Tissue- Tek (Firma Reichert) gefertigte und mit Methylenblau angefärbte Semidünnschnitte (1 µm). Diese wurden am Lichtmikroskop bei 32- bis 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden ausschließlich Hautblöckchen herangezogen, die im Semidünnschnitt Anteile von neoplastischem Gewebe, veränderten Federfollikeln oder hyperplastischer Epidermis aufwiesen. Hiervon wurden Ultradünnschnitte in einer Dicke von 40-60 nm hergestellt, die anschließend auf befilmte Kupferingblenden aufgezogen und mit Uranylacetat / Bleizitrat schnittkontrastiert wurden.

Tabelle I      Arbeitsanleitung, Ultrahistologische Präparation

1.	Fixation	24 h bis einige Tage in Karnovsky
2.	Spülen	3 x 10 min in Cacodylat-Puffer (0,1 M, 4°C)
3.	Osmieren	90 min bis über Nacht in Osmiumtetroxid-Cacodylat- Gemisch (1%)
4.	Spülen	3 x 10 min in Cacodylat-Puffer
5.	Entwässerung	10 min in Ethanol (30%) 10 min in Ethanol (50%) 60 min in Ethanol (70% Alkohol,Uranylacetat, Phosphorwolframsäure) 10 min in Ethanol (80%) 10 min in Ethanol (90%) 10 min in absol. Ethanol 10 min in absol. Ethanol (reinst) 2 x 10 min in Propylenoxid
6.	Kunststoffeinbettung	1. über Nacht in Propylenoxid-Agar-Gemisch (1:1) 2. 3 h in Agar100-Gemisch 3. in Agar100-Gemisch-Kapseln
7.	Polymerisation	12-34 h im Brutschrank (50°C)

Tabelle II Herstellung von Agar100-Gemisch (mittelhart)

Agar100-Gemisch (mittelhart)	Agar100 Resin	24 g
	DDSA (Dodeceny Succinic Anhydride)	16 g
	MNA (Methyl Nadic Anhydride)	10 g
	BDMA (Benzyldimethylamine)	1,5 g

### 3.2.3.3 Ultrastrukturelle Charakterisierung der Hautkarzinomatose

Die ultrastrukturelle Charakterisierung der Hautkarzinomatose erfolgte an 26 neoplastisch veränderten Hautproben. Für Vergleichsuntersuchungen standen 9 unveränderte Hautproben zur Verfügung. Von jeder Probe wurden drei Ultradünnschnitte gewonnen, die anschließend im Transmissionselektronenmikroskop (EM 10A, Firma Zeiss AG) bei 1.200- bis 103.200-fachen Originalvergrößerungen untersucht wurden.

Ultrastrukturell wurde die Gestalt der untersuchten Tumorzellen und ihrer Zellkerne erfaßt. Darüber hinaus wurde die Deutlichkeit der Nukleoli festgehalten und die Anzahl und Gestalt von Mitochondrien, Ribosomen, endoplasmatischem Retikulum, Keratinfilamenten und Desmosomen ermittelt.

### 3.2.4 Enzym- und immunhistochemische Untersuchungen

Mit Hilfe der enzym- und immunhistochemischen Untersuchungen sollten verschiedene Malignitätskriterien, wie Proliferations- und Metastasenaktivität der Tumorzellen sowie die Differenzierung der Entzündungszellpopulationen erfolgen. Darüber hinaus wurde das Zytokeratinprofil der neoplastisch veränderten Hühnerhaut näher untersucht.

#### 3.2.4.1 Probenentnahme und -konservierung

Insgesamt standen 95 neoplastisch veränderte und dreißig unveränderte Hautproben für die enzym- und immunhistochemischen Untersuchungen zur Verfügung.

Ein Teil der immunhistochemischen Untersuchungen erfolgte an den für die Histopathologie präparierten, Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Hautproben. Die Auswertung dieser Präparate erfolgte bereits im Rahmen der histopathologischen Untersuchungen. Danach standen sie für weiterführende Untersuchungen bereit.

Von jeder dieser Proben wurden am Schlittenmikrotom drei Schnitte angefertigt. Diese wurden anschließend einzeln auf silanisierte Objektträger aufgezogen und über Nacht im Brutschrank bei 40°C getrocknet. Auf gleiche Weise erfolgte auch die Vorbereitung der Kontrollproben.

Einige der enzym- und immunhistochemischen Nachweisverfahren erforderten Kryostatschnitte. Für diese Untersuchungen wurden 65 veränderte Hautproben unmittelbar im Geflügelschlachtbetrieb entnommen, wo sie sofort in „tissue tec“, ein Gefrierschutzmedium verbracht und in flüssigem Stickstoff bei -196°C schockgefroren wurden. Bis zu ihrer Weiterverarbeitung lagerten sie bei -80°C.

Am „Cryocut E“ der Firma Reichert-Jung wurden von jedem Hautpräparat vier 4 µm dünne Kryostatschnitte gefertigt. Jeweils der erste von vier Schnitten wurde Hämatoxylin / Eosin gefärbt, um die Eignung des Präparats für das jeweilige Untersuchungsverfahren histologisch zu ermitteln. Erwies sich das Präparat als geeignet, wurden die restlichen drei Kryostatschnitte 20 Minuten im Luftstrom getrocknet und anschließend in 100 %igem Aceton

fixiert. Die Kontrollproben wurden wie beschrieben vorbereitet, wobei hier jedoch die HE-Färbung entfiel.

### 3.2.4.2 Zur B-SA-Methode (Biotin-Streptavidin-Amplifikations-Nachweissystem)

Die B-SA- Methode ist eine Immunfärbemethode mit hoher Sensitivität, die auf der Grundlage der besonders starken Affinität zwischen Biotin und Streptavidin beruht (CASALINI et al. 1997, IZRAILEV et al. 1997).

Bei folgenden Untersuchungen fand die B-SA- Methode Anwendung:

- **Bestimmung des Zytokeratinprofils**
- **Untersuchung der Proliferationsaktivität der Tumorzellen**
- **Untersuchung zur Metastasenaktivität der Tumorzellen**
- **Charakterisierung der Entzündungszellpopulationen im Tumorbereich**

Ein Großteil der genannten Untersuchungen wurde an Paraffinschnitten durchgeführt. Zur Verbesserung der Reaktionsergebnisse war eine Vorbehandlung dieser mit Pronase-Enzym, Mikrowelle oder Autoklav erforderlich. Einige Untersuchungen erfolgten am Kryostatschnitt. Hierbei entfiel die Vorbehandlung.

Tabelle III Reagenzien, B-SA-Methode

<b>Reagenzien</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>
Silan (3-Amino-Propyltriethoxysilan)	Sigma (A3648)
Protease Typ XXV (Pronase E)	Sigma (P6911)
Link-Antikörper	BioGenex (HK 340-9K)
Label-Antikörper	BioGenex (HK 331-9K)
Levamisole	Sigma (9756)
Neufuchsin	Sigma (N 0638)
Natriumnitrit	Merck (6549)
Naphtol-AS-BI Phosphat	Sigma (N 2250)
Dimethylformamid	Merck (3034)

Tabelle IV Herstellung benötigter Lösungen und Materialien, B-SA-Methode

1.	Silan-beschichtete Objektträger (OT)	3-Aminopropyltriethoxysilane Aceton  - OT für 1 min in frische Lösung stellen, anschließend 2 x in Aceton waschen, - im Wärmeschrank über Nacht bei 50°C trocknen	12 ml 588 ml
2.	PBS-Puffer (7.2 pH; 0.01 M)	Natriumdihydrogenphosphat Dikaliumhydrogenphosphat Natriumchlorid Aqua dest.	1,48 g 0,43 g 7,20 g ad 1Liter
3.	0,1 %ige Protease-Lösung	Protease XXV PBS- Puffer	10 mg 10 ml
4.	Citratpuffer (6.0 pH; 0.01 M)	Citronensäure Monohydrat Aqua dest. 2 N NaOH Aqua dest.	2,1 g 900 ml 13 ml ad 1 Liter
5.	Tris HCl Puffer (8.7 pH; 0.05 M)	Trishydroxymethylaminomethan-Base Aqua dest. Salzsäure (1N)  Aqua dest.	6,1 g 900 ml pH 8,7 einstellen ad 1 Liter
6.	Neufuchsin (5%)	Neufuchsin Salzsäure (2N)	5 g 100 ml

## 7. Neufuchsin- Entwickler- Lösung:

Lösung A	Frischer Ansatz von 25 mg Levamisole in 50 ml Tris HCl Puffer.
Lösung B	Frischer Ansatz von 0,1g Natriumnitrit (NaNO <sub>3</sub> , 4%ig) in 2,5 ml Aqua dest. Hiervon 250 µl mit 100 µl Neufuchsin (5%) mischen. Nach einer Reaktionszeit von ca. einer Minute (Luftblasenbildung in hellbrauner Lösung) verwendbar.
Lösung C	Lösen von 25 mg Naphtol- AS- BI- Phosphat in 300 µl Dimethylformamid.

Zunächst wurden die Lösungen A und B gemischt, anschließend die Lösung C hinzugegeben. Die erhaltene Entwickler-Lösung wurde in eine Küvette filtriert, in der schließlich die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgte.

Tabelle V Färbearbeitung, B-SA- Methode (für Paraffin- und Kryostatschnitte)

1. Entparaffinieren	20 min in Xylol, 3 x 4 min in Ethanol absteigender Konzentration (100%, 90%, 70%)
2. Spülen	in Aqua dest. und 3 min in PBS
3. Vorbehandlung	20 min in Pronase (0,1%, 37°C) <u>oder</u> 5 x 2 min in Citratpuffer/Mikrowelle (600 Watt, 20 min abkühlen) <u>oder</u> 30 min Autoklav (1 bar, 15 min abkühlen)
(1.- 3. bei Verwendung von Paraffinpräparaten)	
I. Gewebeschnitt-Trocknung	
II. Fixation	
(I.-II. bei Verwendung von Kryostatschnitten)	
4. Spülen	3 min in PBS
5. Feuchte Kammer anlegen	
6. Primärantikörper/PBS-Verdünnungen anfertigen	
7. Primärantikörper/PBS-Inkubation	30 min
8. Spülen	3 x 5 min in PBS
9. Link-Antikörper (biotiniliert)	20 min
10. Spülen	3 x 5 min in PBS
11. Label-Enzym (Biotin-Streptavidin)	20 min
12. Spülen	3 x 5 min in PBS
13. Neufuchsin-Entwickler-Lösung herstellen	
14. Entwickler-Inkubation	10-30 min
15. Spülen	5 min in PBS
16. Spülen	in Leitungswasser
17. Gegenfärben	30 sec in Hämalaun
18. Bläuen	15 min in Leitungswasser
19. Entwässern	in Ethanol aufsteigender Konzentration (70%, 90%, 100%), Xylol
20. Eindecken	Balsam, Deckglas

### 3.2.4.3 Bestimmung des Zytokeratinprofils

Um Aussagen zur Histogenese der untersuchten Geschwulst treffen zu können, wurde das **Zytokeratinprofil** der neoplastisch veränderten Hühnerhaut untersucht.

In Vorbereitung darauf wurden von insgesamt 45 der bereits histopathologisch untersuchten Hautproben Paraffinschnitte gefertigt. Die getrockneten Paraffinschnitte wurden in Aceton fixiert, nach der Färbearbeitung der B-SA-Methode entparaffiniert und für eine Verbesserung der Reaktionsergebnisse einer Vorbehandlung unterzogen. Dabei kamen drei Vorbehandlungsmethoden zur Anwendung, die auch in Kombination eingesetzt wurden:

- 1 Vorverdauung mittels eiweißspaltendem Enzym Pronase
- 2 Mikrowellenbehandlung
- 3 Hochdrucksterilisation im Autoklav

Für die enzymatische Vorbehandlung wurden die Hautschnitte in einem frisch angesetzten Pronase- PBS- Gemisch für 20 Minuten bei 37°C vorverdaut. Die Mikrowellenbehandlung (600 Watt, 5 x 2 min) erfolgte in einem Coplin-Gefäß, das mit Citratpuffer gefüllt und nur leicht verschlossen wurde. Verdunstete Flüssigkeit mußte regelmäßig durch Aqua dest. ersetzt werden. Zum Abkühlen benötigten die Proben etwa 20 Minuten. Unter Einsatz des Autoklaven (Druck = 1 bar) betrug die Vorbehandlungszeit 30 und die Abkühlungszeit 15 Minuten.

Insgesamt wurden neun verschiedene Zytokeratinmarker (Primärantikörper) untersucht. Hierbei handelte es sich um die monoklonalen Antikörper **AE1**, **AE3**, **KL1**, **CAM5.2**, **LP34**, **Ks7.18**, **LL002**, **E3** und **Ks19.1**. In Tabelle VI sind die verschiedenen monoklonalen Antikörper und ihre Spezifitäten aufgeführt.

Die Positivkontrollen wurden an Paraffinschnitten von gesunder Hundehaut durchgeführt. Bei der Anfertigung der Negativkontrollen entfiel der Einsatz der Primärantikörper.

Tabelle VI Monoklonale Antikörper, Zytokeratinmarker

<b>Antikörper</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>
AE1	CK 10,14,16,19	Maus	AE1	Zymed (18-0153)
AE3	CK 1, 5, 8	Maus	AE3	Zymed (18-0154)
KL1	CK 10/11	Maus	KL1	Immunotech (C0128)
CAM5.2	CK 8/18	Maus	CAM5.2	Becton Dickinson, Heidelberg (7650)
LP34	CK 6, 18	Maus	LP34	Dako (M0717)
Ks7.18	CK 7	Maus	IgG1	Progen (61025)
LL002	CK 14	Maus	CKB1	Sigma (C8791)
E3	CK 17	Maus	CKE3	Sigma (C9179)
Ks19.1	CK 19	Maus	IgG2a	Progen (61010)

Für jeden Zytokeratinmarker wurden in zahlreichen Vorversuchen die sensitivste Vorbehandlungsmethode, die beste Verdünnung und die optimale Entwicklungszeit ermittelt. Die Inkubationszeit des Primärantikörpers in der feuchten Kammer betrug 30 Minuten. Vor und nach dem Auftragen des Link- Antikörpers, der eine Reaktionszeit von 20 Minuten benötigte, wurden die Schnitte gründlich in PBS gespült. Anschließend erfolgten die Inkubation des Label- Enzyms für 20 Minuten und eine weitere Spülung der Präparate in

PBS. Dann wurden die Hautproben in eine Küvette mit frisch angesetztem Neufuchsin-Gemisch verbracht, wobei die optimale Entwicklungszeit für das Substrat im Rahmen von Vorversuchen ermittelt werden mußte. Nach der Kerngegenfärbung erfolgte abschließend das Eindecken der Präparate.

#### **Vorversuche / Zytokeratinprofilbestimmung**

Die Vorversuche zur Zytokeratinprofilbestimmung wurden nach folgenden Versuchsanordnungen durchgeführt:

<b>Antikörper</b>	<b>Antikörper-verdünnungen</b>	<b>Vorbehandlungs-methoden</b>	<b>Entwicklungs-zeit [min]</b>
AE1	1:500	Pronase	30
AE3	1:50, 1:500	Mikrowelle	30
KL1	1:50, 1:70, 1:100	Pronase und / oder Mikrowelle	15, 30
CAM5.2	unverdünnt	Pronase	30
LP34	1:70	Pronase	10, 20
Ks7.18	1:50	Mikrowelle	30
LL002	1:8, 1:20, 1:100, 1:200	Pronase und / oder Mikrowelle, Autoklav	20, 30
E3	1:20	Mikrowelle	30
Ks19.1	1:10	Pronase	30

Die Vorversuche zur Bestimmung des Zytokeratinprofils neoplastisch veränderter Hühnerhaut wurden am Lichtmikroskop bei 32- bis 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Die Beurteilung der Schnitte erfolgte jeweils nach der Intensität der Färbung in bezug auf die jeweilige Verdünnungsstufe des Antikörpers und nach der Intensität der Hintergrundfärbung. Vorversuche, die qualitativ gute Färbeergebnisse aufwiesen, wurden für die Hauptversuche zugelassen.

#### **Hauptversuche / Zytokeratinprofilbestimmung**

Die Hauptversuche zur Zytokeratinprofilbestimmung wurden nach folgenden Versuchsanordnungen durchgeführt:

<b>Antikörper</b>	<b>Antikörper-verdünnungen</b>	<b>Vorbehandlungs-methoden</b>	<b>Entwicklungs-zeit [min]</b>
AE1	1:500	Pronase	30
AE3	1:50	Mikrowelle	30
LP34	1:70	Pronase	20
LL002	1:20	Mikrowelle	30

### 3.2.4.4 Untersuchungen zur Mitoserate und Proliferationsaktivität der Neoplasie

Um einen ersten Hinweis auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Hautkarzinomatose zu erhalten, sollte die **Mitoserate** dieser Neoplasie bestimmt werden. Diese wurde in HE-gefärbten Hautschnitten durch Erfassung von mitotischen Figuren in Geschwulstzellen ermittelt. Am Lichtmikroskop wurden 10 Gesichtsfelder bei einer Vergrößerung von 400:1 ausgezählt. Die Mitoserate ergab sich aus dem Mittelwert der Anzahl dieser 10 Felder, wobei nur eindeutige mitotische Figuren wie „Monaster“ oder „Diaster“ berücksichtigt wurden. Dies sollte eine Verfälschung der Resultate durch Einbeziehung entarteter neoplastischer Zellkerne oder pyknotischer Zellen verhindern.

Die Bestimmung der **Proliferationsaktivität** der Geschwulstzellen sollte einen weiteren Hinweis auf das Wachstumsverhalten dieser Neoplasie liefern. Die Proliferationsaktivität basiert auf sich im Zyklus befindlichen Zellen und äußert sich im Wachstum des Tumors (BRUGAL 1994).

Ein Zellzyklus besteht aus den Phasen G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> und M sowie aus der Ruhephase G<sub>0</sub> (TRERE 1993). Um alle Tumorzellen in der **S- Phase** zu ermitteln, wurde das „**Proliferating cell nuclear antigen**“ (**PCNA**) mit Hilfe der B- SA- Methode und unter Einsatz des monoklonalen (Primär-) Antikörpers PC-10 (Dako), ein Mouse Anti- PCNA- Marker, immunhistochemisch dargestellt. PCNA ist ein 36 kDa Protein, welches als Co- Faktor der DNA- Polymerase  $\delta$  sowohl in der S- Phase als auch während DNA- Reparaturen fungiert (PICH et al. 1992). Das Auftreten von PCNA in der S- Phase ist durch seine stark granuläre Erscheinungsform im Zellkern charakterisiert, so daß zur Bestimmung der Proliferationsaktivität ausschließlich diese Zellen herangezogen wurden. Der sogenannte S-Phasen- Index ergab sich aus dem Anteil PCNA- positiver Zellen auf 100 Tumorzellen. Ausgezählt wurden 500 Zellen unter Benutzung eines Gitters. Mit diesem wurde zunächst im HE- Schnitt die Anzahl von Zellen pro Sektor bestimmt, um dann im immunhistologischen Präparat die PCNA- positiven Zellen pro Sektor zu zählen. Dieser Schritt war notwendig, da nicht markierte Zellen oft schwer voneinander zu differenzieren waren. Die Vergrößerung am Lichtmikroskop betrug auch hier 400:1.

Zur näheren Bestimmung der Wachstumsfraktion, wurden alle Tumorzellen im Zellzyklus mit Hilfe von **MIB-1** (Dianova), ein Mouse Anti- Ki-67- Marker (siehe Tabelle VII), dargestellt. Ki-67 stellt ein nukleäres Antigen dar, welches sowohl in Zellen der **S-, G<sub>2</sub>- und M- Phase** als auch in der **G<sub>1</sub>- Phase nach der Mitose** nachweisbar ist (GERDES et al. 1984). Ki-67- positive Zellen stellten sich stark dunkelbraun gefärbt dar. Die Wachstumfraktion der Hautkarzinomatose ergab sich aus dem Anteil Ki-67- positiver Zellen auf 100 Tumorzellen. Ausgezählt wurden 500 Geschwulstzellen ohne Benutzung eines Gitters.

Die Positivkontrollen wurden an Kryostatschnitten einer Hundetonsille durchgeführt. Für die Negativkontrollen entfiel der Einsatz der Primärantikörper in der Versuchsanordnung.

Tabelle VII Monoklonale Antikörper, Proliferationsmarker

Antikörper	Spezifität	Herkunft	Klon	Hersteller (Bestellnummer)
PCNA	Proliferating cells	Maus	PC-10	Dako (M0879)
MIB-1	Proliferating cells	Maus	MIB-1	Dianova (NS DIA 505)

### Vorversuche / Proliferationsmarker

Die Vorversuche zur Bestimmung der Proliferationsaktivität wurden sowohl an Paraffin- als auch an Kryostatschnitten der neoplastisch veränderten Hühnerhaut durchgeführt. Die Paraffinschnitte wurden von Hautproben gewonnen, welche bereits histopathologisch untersucht worden waren und eine Vielzahl von Geschwulstzellen aufwiesen. Die Kryostatschnitte wurden von zwanzig bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Hautproben gewonnen.

Für jeden Antikörper wurden die geeignete Vorbehandlungsmethode, die beste Verdünnung und die optimale Einwirkzeit ermittelt. Die verschiedenen Vorversuchsanordnungen sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Antikörper	Antikörper-verdünnungen	Vorbehandlungsmethoden	Entwicklungszeit [min]
PCNA	1:50	keine (Kryostatschnitt); Pronase, Pronase und Mikrowelle (Paraffinschnitt)	30
MIB-1	1:10, 1:40	keine (Kryostatschnitt); Mikrowelle (40 min), Pronase und Mikrowelle (Paraffinschnitt)	30

Die Auswertung der Vorversuche erfolgte am Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung. Vorversuche, die qualitativ gute Färbeergebnisse aufwiesen, wurden für die Hauptversuche zugelassen.

### Hauptversuche / Proliferationsmarker

Die Hauptversuche zur Bestimmung der Proliferationsaktivität der neoplastisch veränderten Hühnerhaut wurden ausschließlich an Kryostatschnitten durchgeführt. Diese Untersuchungen erfolgten an zehn erkrankten Hautproben. **PCNA** wurde in der Verdünnung 1:50, **MIB-1** in der Verdünnung 1:40 verwendet. Die Inkubationszeit des Entwicklers betrug in beiden Fällen 30 Minuten.

#### 3.2.4.5 Untersuchungen zur metastatischen Aktivität der Tumorzellen

Gemeinsam mit anderen Malignitätskriterien liefert die Untersuchung der metastatischen Aktivität wichtige Hinweise zur Bestimmung der Dignität einer Geschwulst. Eigens für die Darstellung von Gefäßeinbrüchen wurden 25 histopathologisch „verdächtig erscheinende“ HE- Schnitte der Hühnerhaut selektiert. Von den dazugehörigen Paraffinblöckchen wurden erneut Schnitte gewonnen, die nach Anweisung der B-SA- Methode und unter Verwendung des **von-Willebrand-Faktors (vWF)**, einem polyklonalen Antikörper, untersucht wurden. Zur Verbesserung des Färbeergebnisses erfolgte die Vorbehandlung der Schnitte mit dem eiweißspaltenden Enzym Pronase. Der Antikörper wurde in der Verdünnung 1:400 eingesetzt. Die Inkubationszeit des Entwicklers betrug 30 Minuten.

Bei allen Versuchen wurde als Positivkontrolle ein Hautschnitt eines Jungmasthuhnes mitgeführt, welcher stets ein deutlich identifizierbares Gefäß aufwies. Damit diese Positivkontrolle als positiv befundet wurde, mußte sich das Endothel des Gefäßes deutlich mit Hilfe des Antikörpers gegen von-Willebrand-Faktor anfärben. Außerdem wurde von jeder Gewebeprobe eine Negativkontrolle angefertigt, die zur Kontrolle der Färbemethode diente. Dabei wurde der Gewebeschnitt anstelle des Primärantikörpers mit 50  $\mu\text{l}$  non-negative-

Serum inkubiert. Der Schnitt durfte sich dabei nicht anfärben. Die Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte am Lichtmikroskop bei 32- bis 400-facher Vergrößerung. Mit dieser Nachweismethode wurden neben der erkrankten Hühnerhaut auch Lungen-, Leber- und Nierenproben von fünf erkrankten Hühnern auf Metastasen untersucht.

Tabelle VIII Polyklonaler Antikörper, Darstellung von Gefäßeinbrüchen

<b>Antikörper</b>	<b>Ursprung des Antigens</b>	<b>Herkunft</b>		<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>
Von-Willebrand-Faktor	Plazenta des Menschen	Kaninchen	polyklonal	Dakopatts (A082)

### 3.2.4.6 Charakterisierung der Entzündungszellpopulationen im Tumorbereich

#### 3.2.4.6.1 Differenzierung zwischen B- und T-Lymphozyten

Die Hautkarzinomatose der Jungmasthühner wird von zellulären Infiltrationen begleitet. Zur immunhistochemischen Charakterisierung dieser Infiltrationen wurde die Differenzierung der B- und T-Lymphozyten sowohl an Paraffin- als auch an Kryostatschnitten unter Anwendung der B-SA- Methode vorgenommen. Während für den Nachweis von T-Lymphozyten die T-Lymphozytenmarker CD3, CD4 und CD8 $\beta$  Verwendung fanden, sollten die B-Lymphozyten mit Hilfe der monoklonalen Antikörper CD79 $\alpha$ , IgG und IgM dargestellt werden (siehe Tabelle IX).

Die Erfassung der Lymphozytenhäufigkeit erfolgte durch Auszählung. Der Anteil an B- bzw. T-Zellen ergab sich aus dem Anteil positiv- gefärbter Zellen auf 100 Lymphozyten. Ausgezählt wurden 500 Lymphozyten ohne Benutzung eines Gitters.

Die Positivkontrollen wurden an Milzproben (Kryostatschnitte) Adenovirus- (FAV1-) infizierter Jungmasthühner vorgenommen. Bei der Durchführung der Negativkontrollen entfiel der Einsatz der Primärantikörper in der Versuchsanordnung.

Tabelle IX Monoklonale Antikörper, Lymphozytenmarker

<b>Antikörper</b>	<b>Spezifität</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Ursprung des Antigens</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller (Bestellnummer)</b>
CD3	T-cells	Kaninchen	Mensch	-	Dako (A0452)
CD3	T-cells	Maus	Huhn	CT3	Biozol (8200-08)
CD4	T-cells	Maus	Huhn	CT4	Biozol (8210-08)
CD8 $\beta$	T-cells	Maus	Huhn	EP42	Biozol (8280-08)
CD79 $\alpha$	B-cells	Maus	Mensch	HM57	Dako (M7051)
IgM	B-cells	Maus	Huhn	M1	Biozol (8310-08)
IgG	B-cells	Maus	Huhn	G1	Biozol (8320-08)

#### **Vorversuche** / B- und T-Lymphozyten

Zunächst wurden anhand von Vorversuchen für jeden Antikörper die geeignete Vorbehandlungsmethode, die beste Verdünnung und die optimale Entwicklungszeit ermittelt. Diese Untersuchung wurde an 20 Paraffin- und 20 tiefgefrorenen Hautproben durchgeführt. Die Vorversuchsanordnungen sind in nachstehender Tabelle aufgeführt:

Antikörper	Antikörper-Verdünnungen	Vorbehandlungsmethoden	Entwicklungszeit [min]
CD3 (Dako)	1:40	Pronase, Pronase und Mikrowelle	30
CD3 (Biozol)	1:5, 1:10, 1:20	keine (Kryostatschnitt)	15, 20
CD4	1:10	keine (Kryostatschnitt)	30
CD8 $\beta$	1:5	keine (Kryostatschnitt)	30
CD79 $\alpha$	1:50	Mikrowelle, Pronase und Mikrowelle	30, 40
IgG	1:5, 1:10, 1:15, 1:30, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200	keine (Kryostatschnitt)	15, 30
IgM	1:5, 1:10, 1:50, 1:100	keine (Kryostatschnitt)	15, 30

Die Auswertung der Vorversuche erfolgte am Lichtmikroskop bei 32- bis 400-facher Vergrößerung. Vorversuche, die qualitativ gute Färbeergebnisse aufwiesen, wurden für die Hauptversuche zugelassen.

#### Hauptversuche / B- und T-Lymphyten

Die Hauptversuche wurden an zehn Kryostatschnitten nach folgenden Versuchsanordnungen durchgeführt:

Antikörper	Antikörper-Verdünnungen	Vorbehandlungsmethoden	Entwicklungszeit [min]
CD3 (Biozol)	1:10	keine (Kryostatschnitt)	20
IgG	1:100	keine (Kryostatschnitt)	30
IgM	1:100	keine (Kryostatschnitt)	30

#### 3.2.4.6.2 Identifizierung von Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS)

Während der histopathologischen Untersuchungen waren Zellen des mononukleären phagozytierenden Systems (MPS) im Bereich der erkrankten Hühnerhaut nachweisbar. Mit Hilfe der ANAE- ( $\alpha$ -Naphthylazetat-Esterase) Färbung sollten diese speziell markiert werden. Hierzu wurden Kryostatschnitte von 15 Hautproben aus neoplastisch veränderten Bereichen der Hühnerhaut gefertigt. Diese wurden getrocknet, in Aceton fixiert und nach der Spülung in Aqua dest. für zwei Stunden in das Inkubationsmedium nach STÖTZNER (1983) verbracht. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Methylgrün (2 %ig). Bei Verwendung dieser Methode färbt sich das Zytoplasma der Makrophagen stark rotbraun.

Tabelle X Herstellung der benötigten Lösung, ANAE-Technik

ANAE- Inkubationslösung nach STÖTZNER (1983):

Lösung A	Lösen von 0,1 g Pararosanilin (Merck, Deutschland) in 25 ml 2N HCl unter leichtem Erwärmen. Filtration der abgekühlten Flüssigkeit und Aufbewahrung im Kühlschrank.
Lösung B	Frischer Ansatz einer 4 %igen wässrigen Natriumnitritlösung.

Zunächst wurden die Lösungen A und B zu gleichen Teilen (je 1,2 ml) zusammengegeben. Nach der Reaktionszeit von einer Minute entstand hexazotiertes Pararosanilin (gelbe Lösung). 40 mg  $\alpha$ -Naphthylazetat (Chemapol, CSFR) wurden in 0,4 ml Aceton gelöst und anschließend in 80 ml Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (pH 5,8 , 0.067 M) gegeben. Dann wurde dieser Lösung das hexazotierte Pararosanilin zugemischt. Die Einstellung des pH-Wertes der Lösung auf 5,8 erfolgte mit 2N NaOH.

Tabelle XI Färbearbeitung, ANAE-Technik (für Kryostatschnitte)

1.	Gewebeschnitt-Trocknung	20 min im Luftstrom
2.	Fixation	5 min in Aceton
3.	Spülen	in Aqua dest.
4.	Inkubation	2 h in Inkubationsmedium (nach STÖTZNER 1983)
5.	Spülen	in Aqua dest
6.	Gegenfärben	2 min in Methylgrün (2%)
7.	Entwässern	in Ethanol aufsteigender Konzentration (70%, 90%, 100%), Xylol
8.	Eindecken	Balsam, Deckglas

Die Erfassung der Makrophagenhäufigkeit erfolgte durch Auszählung. Der Anteil an Makrophagen ergab sich aus dem Anteil rotbraun gefärbter Zellen auf 100 Entzündungszellen. Im Bereich der zellulären Infiltrationen wurden 500 Zellen ohne Benutzung eines Gitters am Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgezählt.

Die Positivkontrollen erfolgten an Proben von gesunder Hundehaut. Für die Negativkontrollen wurde das Inkubationsmedium ohne  $\alpha$ -Naphthylacetat und ohne Pararosanilin hergestellt.

### 3.2.5 Untersuchungen zur ätiologischen Beteiligung von Viren

#### 3.2.5.1 Elektronenmikroskopischer Nachweis von Viruspartikeln

Während der ultrastrukturellen Charakterisierung der Hautkarzinomatose wurden in einigen neoplastisch veränderten Hautproben elektronenmikroskopisch virusähnliche Partikel nachgewiesen. Daraufhin erfolgte eine gezielte elektronenmikroskopische Untersuchung von 60 neoplastisch veränderten und 20 unveränderten Hautproben nach vorheriger Auswahl im Semidünnschnitt. Viruspartikel wurden bevorzugt in den Hautabschnitten vermutet, die reich an Tumorzellen waren. Von den unveränderten Hautproben wurden bevorzugt solche elektronenmikroskopisch untersucht, die einen hohen Anteil an Epithelzellen aufwiesen.

Insgesamt wurden von 26 tumorös veränderten und neun unveränderten Hautproben 153 Ultradünnschnitte gefertigt und elektronenmikroskopisch in Vergrößerungen bis 103.200-

fach untersucht. Die nachgewiesenen Viruspartikel ähnelten morphologisch den Erregern der aviären Onkovirose der Hühner.

### 3.2.5.2 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zum Nachweis von Virusantigenen und -antikörpern

Auf Grund des elektronenmikroskopischen Nachweises von retrovirusähnlichen Partikeln wurden Untersuchungen zur enzym-immunologischen Charakterisierung dieser Partikel durchgeführt. Diese Untersuchungen hatten lediglich orientierenden Charakter und erfolgten, abgesehen von der Probenentnahme, am Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin und im Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH.

#### Probenentnahme und -konservierung

Für den ELISA wurden zwölf neoplastisch veränderte Hautproben direkt im Geflügelschlachtbetrieb entnommen und bis zu ihrer Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  tiefgekühlt. Von vier der betroffenen Tiere erfolgte gleichzeitig die Entnahme von Kloakentupfern, welche in 1 ml PBS bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden.

Aus der selben Herde wurden von elf betäubten, hautgesunden Jungmasthühnern Vollblutproben gewonnen. Die Zugabe von Natrium-Citrat verhinderte deren Gerinnung. Das Blut wurde anschließend auf  $+8^{\circ}\text{C}$  gekühlt.

Für die Kontrolluntersuchungen wurden fünf Hautproben von gesunden Masthähnchen entnommen, welche bis zu ihrer Untersuchung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt wurden.

#### Aufbereitung der Proben

Während die Vollblutproben ohne Aufbereitung verwendet werden konnten, wurden die Kloakentupfer einem dreifachen Friertau-Prozess unterzogen.

Die Hautproben wurden zunächst mit einer Schere zerkleinert, anschließend mittels Ultra Turrax (Firma IKA-Labortechnik) homogenisiert, einem dreimaligen Friertau-Prozess unterzogen und für zehn Minuten bei 3000 upm zentrifugiert. Für die weiteren Untersuchungen wurde der Überstand verwendet.

#### Antigennachweis

Die elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Viruspartikel ähnelten morphologisch den Erregern der aviären Onkovirose der Hühner. Hierzu zählen das als *Oncovirus Typ C* zu den *Retroviridae* gehörende aviäre Leukosevirus (ALV), dessen onkogene Varianten, die aviären Leukose-Sarkom-Virusstämme (ALSV) sowie das Retikuloendotheliose-Virus (REV, LÖLIGER 1992).

Da Virusinfektionen mit aviären Leukoseviren bei Hühnern relativ häufig auftreten, sollte zunächst mit Hilfe eines Antigen-ELISAs das Virus-core-Protein **p27** nachgewiesen werden. Hierbei handelt es sich um ein „inneres Protein“, welches aviäre Leukoseviren aller Subtypen und auch endogene Viren besitzen. Für diese Untersuchung wurde der ELISA-Testkit der Firma IDEXX (Wörstadt, Deutschland) verwendet.

Für den Virus-Antigennachweis standen vier Kloakentupfer- und zwölf Hautproben von betroffenen Jungmasthühnern zur Verfügung. Die Hautproben wurden in vier Pools à drei Proben zusammengefaßt. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung von fünf Haut- und elf Vollblutproben von gesunden Jungmasthühnern der selben Herde.

Die unveränderten Hautproben wurden in einer Vorverdünnung von 1 : 5 eingesetzt. Alle übrigen Proben wurden unverdünnt verwendet.

Die Ergebnisse des IDEXX-ELISA wurden in einem S/P- (sample/ positiv control-) ratio angegeben, der sich wie folgt berechnet:

$$S/P = \frac{\text{Probenmittelwert} - \text{Mittelwert der Negativkontrolle}}{\text{Mittelwert der Positivkontrolle} - \text{Mittelwert der Negativkontrolle}}$$

Die Proben wurden Leukosevirusantigen-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.

#### Antikörpernachweis

Das aviäre Leukosevirus und dessen onkogenen Varianten werden auf Grund ihrer unterschiedlichen Antigenstruktur in den Glykoproteinen der Virushülle (Envelope) in acht Untergruppen unterteilt (LÖLIGER 1992). Die meisten der spontan vorkommenden aviären Onkovirusstämme gehören zu den Untergruppen A und B. Seit einigen Jahren wurden zunehmend Leukoseviren der Untergruppe J in Jungmasthuhnbeständen beobachtet. Infektionen mit aviären Leukoseviren der Untergruppen C und D sowie mit Retikuloendothelioseviren (REV) hingegen waren bislang unter den Feldinfektionen nur sehr selten nachweisbar.

Zur Differenzierung der am häufigsten beim Huhn vorkommenden Untergruppen wurde ein Antikörpernachweis mittels ELISA an Vollblutproben von 11 Jungmasthühnern durchgeführt. Für diese Untersuchung stellt die indirekte ELISA- Methode ein etabliertes Verfahren dar (Prinzip dieser Methode: siehe PULVERER und SCHAAL 1988).

Da der Antikörpernachweis serotypspezifisch ist, mußte er für jede Virusuntergruppe getrennt durchgeführt werden. Während im Institut für Geflügelkrankheiten der IDEXX-ELISA auf die Antikörper der aviären Leukosevirusuntergruppe J durchgeführt wurde, erfolgten im Veterinärlabor der Lohmann Tierzucht GmbH die Nachweisuntersuchungen auf die Antikörper der aviären Leukosevirusuntergruppen A, B sowie auf Retikuloendothelioseviren. Die Proben wurden, wie für den Test vorgeschrieben, in der Verdünnung 1:500 eingesetzt.

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.