

**Beitrag zur Klärung  
der Marek-Herpesvirus-Ätiologie  
einer mit Allgemeinsymptomen und Tumoren  
einhergehenden Krankheit von Mastputen mittels  
klinischer, pathologischer, histologischer,  
virologischer, serologischer und  
molekularbiologischer (PCR) Methoden**



**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Kathrin Erika Voelckel**

Aus der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

---

**Beitrag zur Klärung der Marek-Herpesvirus-Ätiologie  
einer mit Allgemeinsymptomen und Tumoren  
einhergehenden Krankheit von Mastputen mittels  
klinischer, pathologischer, histologischer, virologischer,  
serologischer und molekularbiologischer (PCR) Methoden**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

Eingereicht von  
Kathrin Erika Voelckel  
Tierärztin aus Al Khobar / Saudi Arabien

Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E. F. Kaleta

2. Berichterstatter: PD Dr. N. Tautz

Tag der mündlichen Prüfung  
15.12.2003

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet



## ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
A. bidest	Aqua bidestillata
A. dest	Aqua destillata
AGPT	Agargelpräzipitationstest
ALSV	Aviäre Leukose-Sarkom-Viren
att.	attenuiert
BME	Basal Medium Eagle's
Bp	Basenpaare
BUT	British United Turkeys
bZIP	basic region leucine zipper protein
c	Konzentration
°C	Grad Celcius
CCD	charge coupled device
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpE	zytopathogener Effekt
CSV	Küken-Synzytial-Virus
DIAV	Infektiöse-Anämie-Virus der Enten
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure
DPB	Dulbecco's Phosphate Buffer
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymintriphosphat
E	Extinktion
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEF	Enten-Embryo-Fibroblasten-Kulturen
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
FKS	fetales Kälberserum
FFE	Federfollikelepithel
g	Gramm oder Erdbeschleunigung (9,81 m/sec <sup>2</sup> )
GGD	Geflügelgesundheitsdienst
gp	Glykoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEF	Hühner-Embryo-Fibroblasten-Kulturen
HENZ	Hühner-Embryo-Nierenzell-Kulturen
Hepes	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
HNZ	Hühner-Nierenzell-Kulturen
ICP	Infected cell protein
I.E.	Internationale Einheiten

IR	Internal repeat
IUDR	5-Jodo-2-Desoxy-Uridin
KID <sub>50</sub>	Kultur-infektiöse Dosis 50%
l	Liter
LLV	Lymphoide Leukosevirus
L-meq	MKV EcoRI-Q-Gen mit zusätzlicher Nukleinsäuresequenz
LPD	Lymphoproliferative Krankheit der Pute
LPDV	Virus der Lymphoproliferativen Krankheit der Pute
LTR	Long terminal repeats
m	Milli (10 <sup>-3</sup> )
MATSA	Marek's disease tumor-associated surface antigen
MEM	Minimum Essential Medium
meq	MKV EcoRI-Q-Gen
min	Minuten
MK	Mareksche Krankheit
MKV	Virus der Marekschen Krankheit (Serotyp 1)
MKV2	Serotyp 2 des Virus der Marekschen Krankheit
mm	Millimeter
mol	molar, Mol pro Liter
MW	Molekulargewicht
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
N.	Nervus
nrdREV	nicht replikationsdefektes REV
onc-Gen	Onkogen
ORF	open reading frame
p	Pico (10 <sup>-12</sup> )
pp	phosphorylierte Proteine
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PHV	Puten-Herpesvirus
p.i.	post infectionem
rdREV	replikationsdefektes REV
RE	Retikuloendotheliose
REV	Retikuloendotheliosevirus
RNA	Ribonukleinsäure
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPF	spezifiziert pathogenfrei
SNV	Milznekrose-Virus
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Tgb-Nr.	Tagebuch-Nummer
TE	Tris-EDTA
tfl	Thermus flavus
TPB	Tryptose-Phosphat-Brühe
TR	Terminal repeat

Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
U <sub>L</sub>	Unique long
U <sub>S</sub>	Unique short
UV	Ultraviolett
VN	Virusneutralisation
z.T.	zum Teil



# INHALTSVERZEICHNIS

## ABKÜRZUNGEN

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Einführung</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Die Lymphoproliferative Krankheit der Puten (LPD)</b>	<b>3</b>
2.2.1	Ätiologie der LPD	3
2.2.2	Epidemiologie der LPD	4
2.2.3	Pathogenese der LPD	5
2.2.4	Klinisches Bild und Pathologie der LPD	6
2.2.5	Diagnose der LPD	8
2.2.6	Prophylaxe und Kontrolle der LPD	9
<b>2.3</b>	<b>Die Retikuloendotheliose (RE)</b>	<b>10</b>
2.3.1	Ätiologie der RE	11
2.3.2	Epidemiologie der RE	13
2.3.3	Pathogenese und Immunogenese der RE	14
2.3.4	Klinisches Bild und Pathologie der RE	15
2.3.5	Diagnose der RE	16
2.3.6	Prophylaxe und Kontrolle der RE	17
<b>2.4</b>	<b>Die Mareksche Krankheit (MK)</b>	<b>18</b>
2.4.1	Ätiologie der MK	19
2.4.1.1	Morphologie der MKV, MKV2 und PHV	20
2.4.1.2	Viruspezifische Antigene der MKV, MKV2 und PHV	24
2.4.1.3	Pathotypen des MKV	25

---

2.4.2	Epidemiologie der MK	29
2.4.3	Pathogenese der MK beim Haushuhn	29
2.4.4	Klinisches Bild und Pathologie der MK beim Haushuhn	31
2.4.5	Diagnose der MK	33
2.4.6	Prophylaxe und Kontrolle der MK	34
<b>2.5</b>	<b>Die MK bei Puten</b>	<b>35</b>
2.5.1	Experimentelle Infektionen von Puten mit aus Hühnern bzw. Laborputen isolierten MKV	35
2.5.2	Feldinfektionen mit MKV bei Puten	40
2.5.3	Experimentelle Infektionen von Puten und Hühnern mit aus natürlich infizierten Puten isolierten MKV	43
<b>2.6</b>	<b>Fragestellungen der eigenen Untersuchungen</b>	<b>44</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Material</b>	<b>46</b>
3.1.1	Herkunft des Untersuchungsmaterials	46
3.1.2	Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien	54
3.1.3	Kontroll-DNA für die PCR	62
3.1.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien	63
<b>3.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>64</b>
3.2.1	Zellkulturen	64
3.2.1.1	Herstellung von Hühnerembryofibroblasten-Kulturen (HEF)	64
3.2.1.2	Herstellung von HEF-Subkulturen	65
3.2.1.3	Herstellung von Hühnerembryo-Nierenzellkulturen (HENZ)	65
3.2.1.4	Herstellung von Pekingentenembryofibroblasten-Kulturen (EEF)	66
3.2.1.5	Gewinnung peripherer Leukozyten	66
3.2.3	Aufarbeitung der Gewebeproben für die Virusisolation	67
3.2.4	Passagierung der Zellkulturen	68
3.2.5	Lagerung von Virusisolaten	68

---

3.2.6	Kultivierung unter Agar-Overlay	68
3.2.7	Chloroformbehandlung	69
3.2.8	Kultivierung mit IUDR	69
3.2.9	Virusneutralisationstest	70
3.2.10	Aufarbeitung der Gewebeproben für die histologische Untersuchung	71
3.2.10.1	Fixierung der Gewebeproben	71
3.2.10.2	Einbettung in Paraplast	71
3.2.10.3	Anfertigung der Gewebeschnitte	71
3.2.10.4	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	72
3.2.10.5	Anfertigung von Gefrierschnitten	72
3.2.11	Präparation der DNA aus Gewebe- und Blutproben	72
3.2.12	Vorbereitung der Oligonukleotidprimer für die PCR	73
3.2.13	Reaktionsgemische für die PCR	74
3.2.14	Zyklusbedingungen der PCR	75
3.2.15	Nachweis der PCR-Produkte durch analytische Agarose-Gel-Elektrophorese	76
3.2.16	Nicht selbst durchgeführte Untersuchungen	76
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>78</b>
<b>4.1</b>	<b>Klinische Bilder erkrankter Puten</b>	<b>78</b>
4.1.1	Klinisch unspezifischer Verlauf bei Puten mit tumorösen Veränderungen	78
4.1.2	Asymptomatischer Verlauf bei Puten mit tumorösen Veränderungen	78
4.1.3	Spezifischer Verlauf bei Puten mit tumorösen Veränderungen	79
4.1.4	Klinische Befunde bei Puten ohne tumoröse Veränderungen	79

<b>4.2</b>	<b>Pathologisch-anatomische Befunde</b>	79
4.2.1	Pathologisch-anatomische Befunde bei Puten mit Tumoren	79
4.2.2	Pathologisch-anatomische Befunde bei Puten ohne Tumoren	84
<b>4.3</b>	<b>Pathohistologische Befunde</b>	85
4.3.1	Pathohistologische Befunde bei Puten mit Tumoren	85
4.3.2	Pathohistologische Befunde bei Puten ohne Tumoren	86
<b>4.4</b>	<b>Virologische Befunde</b>	87
<b>4.5</b>	<b>Serologische Befunde</b>	89
<b>4.6</b>	<b>Ergebnisse der PCR</b>	91
<b>4.7</b>	<b>Übersicht über die Befunde der auf Betrieb A zeitgleich eingestellten mit CVI 988 geimpften und ungeimpften Puten</b>	93
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	97
<b>5.1</b>	<b>Identifizierung des Erregers der tumorösen Veränderungen</b>	98
<b>5.2</b>	<b>Anwendung der PCR zum Nachweis der DNA des REV, LPDV und MKV aus Tumorgewebe und Buffy-Coat- Zellen von Puten</b>	100
5.2.1	Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung falsch-positiver bzw. falsch-negativer Ergebnisse der PCR	101

---

<b>5.3</b>	<b>Vergleich der erhobenen Daten und Ergebnisse der klinischen, pathologisch-anatomischen, pathohistologischen, virologischen und serologischen Untersuchungen mit den aus der Literatur gewonnenen Erkenntnissen über die MK bei Puten</b>	<b>102</b>
5.3.1	Anamnese und klinisches Bild	103
5.3.2	Pathologisch-anatomische und pathohistologische Befunde	105
5.3.3	Virologische und serologische Untersuchungen	107
<b>5.4</b>	<b>Möglichkeiten der Vakzinierung von Puten gegen die MK</b>	<b>108</b>
<b>5.5</b>	<b>Überlegungen zur Frage warum die MK bei Puten auftritt</b>	<b>109</b>
<b>5.6</b>	<b>Ausblick</b>	<b>110</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>115</b>

**ANHANG**



## 1 EINLEITUNG

Durch die in den letzten Jahren stark zunehmende Haltung von Puten in Deutschland ist auch der Anspruch an die tierärztliche Versorgung in prophylaktischer, diagnostischer und therapeutischer Hinsicht ständig gewachsen.

Neben dem großen Arbeitsgebiet der Erforschung der optimalen Haltungs- und Fütterungsbedingungen stellen die Infektionskrankheiten der Pute einen sehr wichtigen Bereich des wissenschaftlichen Interesses dar.

Gelegentlich werden Tierärzte und Tierhalter mit pathologischen Bildern konfrontiert, die sich nicht immer durch bekannte Krankheitsursachen erklären lassen. Die Fragestellung dieser Arbeit entstand aus einer solchen Situation heraus.

Seit 1996 wurden in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität wiederholt Puten mit Tumoren zur Untersuchung und Klärung der Ätiologie des Krankheitsgeschehens verbracht. Aufgrund der anamnestischen und klinischen Daten konnte von einem infektiösen Geschehen ausgegangen werden.

Natürlich auftretende, viral bedingte Tumoren bei Puten wurden bisher ursächlich dem Retikuloendotheliosevirus (REV) oder dem Virus der Lymphoproliferativen Krankheit der Pute (LPDV) zugeordnet. 1995 wurde erstmals aus Frankreich über das Auftreten der tumorösen Form der Marekschen Krankheit (MK) in einem Mastputenbestand berichtet (COUDERT et al., 1995).

Zur Erreichung des Ziels dieser Arbeit - Kenntnisse über die Ursachen der vorgefundenen tumorösen Veränderungen zu erhalten - wurde unter Anwendung klinischer, pathologisch-anatomischer, histologischer, serologischer, virologischer und molekularbiologischer Techniken nach dem ätiologischen Agens der aufgetretenen Tumoren gesucht.

## 2 LITERATURÜBERSICHT

### 2.1 Einführung

Bereits 1939 beschrieben ANDREWES and GLOVER in Großbritannien eine voranschreitende Lähmung bei einem adulten Putenhahn und befanden die pathohistologischen Veränderungen der Leber und der Nerven als typisch für die Geflügel-Paralyse, als welche die von MAREK (1907) entdeckte Polyneuritis bei Hühnern bezeichnet wurde.

Weitere Beschreibungen tumoröser Veränderungen bei Puten finden sich sporadisch, etwa durch SIMPSON et al. (1957), die in einer Herde Mastputen viszerale Lymphomatose diagnostizierten oder durch McKEE et al. (1963), deren Untersuchung an Putenschlachtskörpern in Hinblick auf leukotische Veränderungen erfolgte. Als ähnlich der Marekschen Krankheit wurden 1970 bei zwei Wildputen und 1974 in einem niederländischen Mastputenbestand gefundene Veränderungen eingestuft (BUSCH und WILLIAMS, 1970; VOÛTE und WAGENAAR-SCHAAFSMA, 1974).

Im nachhinein ist es natürlich nicht möglich zu beurteilen, ob das auslösende Agens das Virus der Marekschen Krankheit (MKV) war oder ob es sich um eine Infektion mit dem Virus der Lymphoproliferativen Krankheit der Pute (LPDV) oder dem Retikuloendotheliosevirus (REV) handelte.

Die folgende Literaturübersicht soll einen Überblick über diese viral bedingten Tumoren, insbesondere im Hinblick auf Klinik, Pathologie und diagnostische Möglichkeiten, geben.

## 2.2 Die Lymphoproliferative Krankheit der Puten (LPD)

Diese von BIGGS et al. (1974) erstmals beschriebene neoplastische Erkrankung ist bislang gelegentlich in Großbritannien, Israel und Österreich nachgewiesen worden (PERK et al., 1978; TIPOLD et al., 1987). Nach NEUMANN (1992) läßt sich aufgrund mündlicher Mitteilungen aus dem In- und Ausland ein weltweites Vorkommen der LPD annehmen. Die LPD kann sporadisch oder enzootisch auftreten, im letzteren Fall erreicht die Mortalität bis zu 25 % und verursacht damit hohe wirtschaftliche Verluste.

### 2.2.1 Ätiologie der LPD

Bei dem Erreger der LPD handelt es sich um ein exogenes C-Typ-Retrovirus, welches eine eigene Gruppe innerhalb der Familie der Retroviridae repräsentiert (McDOUGALL et al., 1978a; GAZIT et al., 1979; PATEL und SHILLETTO, 1987a; PERK et al., 1979, YANIV et al., 1995). Es besteht keine antigenetische Ähnlichkeit mit den aviären Leukose-Sarkom-Viren (ALSV) oder dem Retikuloendotheliose-Virus (REV), Nukleinsäure-Hybridisationen zeigen keine Gensequenzhomologien des LPDV mit dem REV oder dem aviären Myeloblastose-Virus (AMV) (YANIV et al., 1979). Neuere, auf Gensequenzierungen beruhende Forschungsergebnisse lassen vermuten, daß das LPDV entwicklungsgeschichtlich den Rous-Sarkom-Viren (RSV) am nächsten steht (SARID et al., 1994a; YANIV et al., 1995).

Das behüllte Virus mit einem Durchmesser von etwa 110 nm hat einen konzentrisch gelegenen, ikosaedrischen Innenkörper (Viruskapsid, Core), der aus Kapsidproteinen (CA) besteht. Das Kapsid enthält zwei identische Moleküle einzelsträngiger RNA als Erbinformation, welche jeweils mit Nukleokapsidproteinen (NC) verbunden sind. Zwischen Kapsidmembran und Hülle befindet sich die Matrix, welche aus Matrixproteinen (MA) besteht und die Innenseite der Hülle auskleidet. Die aus der Zellmembran der Wirtszelle gewonnene Hülle ist Träger der transmembranen Proteine (TP), die im Virus verankert sind und außen nichtkovalent mit den externen

Glykoproteinen (EP, receptor binding glycoprotein) verbunden sind (PERK et al., 1979; COFFIN et al., 1995; MODROW und FALKE, 1997).

Das für Retroviren typische Enzym Reverse Transkriptase (RT) kann beim LPDV durch Zugabe von Mangan, am besten aber durch Magnesium aktiviert werden (YANIV et al., 1979).

Im Genom des LPDV wurden bisher vier längere und vier kürzere offene Leserahmen (open reading frames = ORFs) entdeckt. Die vier längeren ORFs (*gag*, *pro*, *pol* und *env*) kodieren für die gruppenspezifischen Antigene (NC, MA, CA und ein noch nicht näher definiertes Protein p31), die enzymatischen Aktivitäten (eine Proteinase, die Reverse Transkriptase und weitere Enzyme) und die Hüllproteine (TP, EP). Die Funktion und Wichtigkeit der kleineren ORFs ist bisher nicht bekannt (SARID et al., 1994a). GAK et al. (1989) untersuchten das Genom hinsichtlich des Vorliegens eines Onkogens. Es konnte keines von 20 bekannten viralen Onkogenen und auch kein Onkogen der Wirtszelle nachgewiesen werden. Das bei der Virusreplikation entstehende Provirus hat an Anfang und Ende sich wiederholende Sequenzen, sogenannte long terminal repeats (LTRs), die keine Sequenzhomologien mit den LTRs der REV und ALSV aufweisen (GAK et al., 1991).

### **2.2.2 Epidemiologie der LPD**

Das natürliche Auftreten der LPD wurde bislang nur bei Puten nachgewiesen. IANCONESCU et al. (1983) untersuchten die Empfänglichkeit von Enten, Gänsen und Hühnern für eine parenterale Infektion mit LPDV. Lediglich bei den Hühnern konnte eine persistierende Virämie nachgewiesen werden und sehr selten fanden sich histologische und teilweise auch pathologisch-anatomische Veränderungen in deutlich geringerem Ausmaß als bei Puten. Es liegen nur wenige Erkenntnisse über die Infektionswege bei Puten vor. McDOUGALL et al. (1978a) konnten die horizontale Ausbreitung des Virus nachweisen, nach BIGGS (1997a) ist eine vertikale Infektion nicht auszuschließen.

Beobachtungen über die unterschiedliche Empfänglichkeit von Puten verschiedener genetischer Herkünfte, konnten unter experimentellen Bedingungen nicht bestätigt werden. Auch über eine vermutete höhere Krankheitsanfälligkeit männlicher Tiere liegen bislang keine gesicherten Daten vor (BIGGS et al., 1978; McDOUGALL et al., 1978a; IANCONESCU et al., 1979; IANCONESCU et al., 1981).

### 2.2.3 Pathogenese der LPD

Die Zielzellen des LPDV sind Lymphozyten und ihre Stammzellen. Untersuchungen nach experimenteller Infektion zeigen, daß das Virus primär Knochenmarkszellen infiziert und mit der Auswanderung der Vorläuferzellen in Thymus (ab dem 5. Tag p.i. nachweisbar), Bursa Fabricii und Milz (ab dem 10. Tag p.i. nachweisbar) gelangt. Im weiteren Verlauf wurde das Virus auch in anderen Organen wie Pankreas, Leber, Gehirn und Haut nachgewiesen. Dies ist Folge der Einwanderung von zirkulierenden Lymphozyten, es findet keine Infektion der Organzellen statt (GAZIT et al., 1982; GAZIT et al., 1983).

Frühe histologische Veränderungen finden sich ab dem 10. Tag p.i. in Form von lymphoproliferativen Veränderungen in der Milz, wenig später in Thymus, Pankreas, Leber und gelegentlich auch anderen Organen. Die frühen histologischen Veränderungen finden sich bei allen infizierten Tieren, führen aber nur bei 20-30% der Tiere zur Entwicklung der proliferativen Erkrankung, bei den anderen kommt es trotz zeitlich bestehender Virämie zu einer Regression der Veränderungen (McDOUGALL et al., 1978a).

Verschiedene Forschungsergebnisse lassen die Vermutung zu, daß T-Lymphozyten die Onkogenität vermitteln. So finden sich im Knochenmark und der Bursa Fabricii lediglich hohe Replikationsraten des Virus, aber keine pathologisch-anatomischen Veränderungen, wie sie v. a. in Thymus, Milz und Pankreas ab dem 15. Tag p.i. zu finden sind (IANCONESCU, 1979; GAZIT et al., 1982; GAZIT et al., 1983). ZIMBER et al. (1984) konnten keinen Unterschied hinsichtlich Virämie und Krankheitsgeschehen zwischen bursektomierten und intakten Puten feststellen und dadurch die Vermutung,

die LPD-Tumorzellen könnten antikörperproduzierende B-Lymphozyten sein, widerlegen.

Das Alter zum Zeitpunkt der Infektion ist für den Verlauf der Krankheit mit entscheidend. Puten, die als Eintagsküken infiziert werden, zeigen eine signifikant niedrigere Morbidität und Mortalität als Tiere, die im Alter von 3-4 Wochen infiziert werden. Zur Erklärung dieses Phänomens kommt zum einen die Möglichkeit des vorliegens maternalen Antikörper in Frage, oder die Eintagsküken zeigen aufgrund ihrer immunologischen Unreife, und damit des Fehlens geeigneter Zielzellen der lymphatischen Reihe, eine gewisse „Krankheitsresistenz“ (McDOUGALL et al., 1978a; IANCONESCU et al., 1981).

#### **2.2.4 Klinisches Bild und Pathologie der LPD**

Der überwiegende Teil der betroffenen Tiere ist bis zum Zeitpunkt des Todes klinisch unauffällig und in einem guten Ernährungszustand. Die klinischen Symptome sind, falls überhaupt vorhanden, sehr unspezifisch und beschränken sich auf ein gesträubtes Gefieder, reduzierte Futteraufnahme, Unfähigkeit sich Fortzubewegen und blasse Schleimhäute (BIGGS et al., 1978; IANCONESCU et al., 1979).

Bei Feldausbrüchen wurde eine erhöhte Mortalität ab der 8.-10. Lebenswoche beobachtet, mit einem Peak in der 16. Lebenswoche. Unter experimentellen Bedingungen traten erste Todesfälle 4 Wochen nach der intraperitonealen Infektion von Eintagsküken auf. Die Mortalitätsraten schwanken, es konnten Verluste bis zu 25% vermerkt werden (BIGGS et al., 1978; McDOUGALL et al., 1978a; IANCONESCU et al., 1979).

Pathologisch-anatomische Veränderungen finden sich v.a. in Milz, Thymus, Pankreas und Leber. Die Milz ist hochgradig vergrößert, weißlich oder blaßrot und teilweise marmoriert. Auch die Leber ist hypertrophiert und zeigt viele, miliare grau-weiße Herde im gesamten Parenchym, die gelegentlich zu einem größeren Areal mit unregelmäßigen

Grenzen konfluieren. Häufig sind Pankreas und Thymus umfangsvermehrt, rötlich verfärbt und zeigen eine diffuse Infiltration mit kleinen, grau-weißen Herden. Ähnliche Veränderungen finden sich seltener in Nieren, Gonaden, Darmwänden, Lungen und Myokard, gelegentlich sind auch periphere Nerven vergrößert. Größere Tumore kommen selten vor (BIGGS et al., 1978; IANCONESCU et al., 1979; GAZIT et al., 1982; ZIMBER et al., 1983).

Histologisch können drei Stadien unterschieden werden.

Die frühen lymphoiden Läsionen sind ab der zweiten Woche p.i. in Milz, Thymus, Leber und Gonaden, im weiteren Krankheitsverlauf auch in anderen Organen, wie Pankreas, Nieren, Herz, Lunge, Knochenmark, Nerven u.a., zu finden. Sie zeichnen sich durch eine Infiltration der betroffenen Gewebe mit Lymphozyten und wenigen Lymphoblasten, Plasmazellen und Retikulumzellen aus. Bei herdförmiger Infiltration finden sich häufig zentrale Zelldegenerationen, gelegentlich sind plasmazelluläre Reaktionen am Rand der Läsionen erkennbar. Im Thymus kommt es zu einer Hypertrophie des Markanteils, in welchem v.a. Lymphoblasten, Retikulum- und Plasmazellen zu sehen sind, und zu einer Atrophie der Rinde.

Die nächste Phase der histologisch erkennbaren Veränderungen geht mit der Ausbildung pathologisch-anatomischer Veränderungen einher. Die deutlich größeren Läsionen zeigen ein heterogenes Zellbild, sie enthalten mehr Lymphoblasten und Plasmazellen als in der ersten Phase. Zahlreiche Mitosen verdeutlichen das progressive Wachstum des tumorösen Prozesses. Die physiologischen Organstrukturen gehen verloren und die Thymusrinde ist nahezu atrophiert. Wenn die peripheren Nerven betroffen sind, findet sich eine eher herdförmige Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen.

Bei einem Teil der Tiere sind die Veränderungen so stark ausgeprägt, daß sie zum Tod der Tiere führen. Der größte Teil der erkrankten Puten ist jedoch in der Lage den proliferativen Prozeß zu überwinden. Die dann vorgefundenen histologischen Bilder werden als dritte (regressive) Phase angesprochen und sind diskrete, fokale Infiltrationen mit reifen Lymphozyten, die sich gut abgegrenzt vom umliegenden Gewebe darstellen.

Da die Infektion der verschiedenen Organe zu unterschiedlichen Zeitpunkten stattfindet, können alle drei Stadien in einem Tier vorgefunden werden (BIGGS et al., 1978; IANCONESCU et al., 1979; McDOUGALL et al., 1978a; ZIMBER et al., 1983).

### 2.2.5 Diagnose der LPD

Bislang ist es nicht gelungen geeignete Zellkultursysteme zur Isolierung und Vermehrung des LPDV *in vitro* zu finden. Neben dem Vorliegen von typischen pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen, liefern deshalb verschiedene Testverfahren Nachweise zum Vorliegen einer LPDV-Infektion.

Der Reverse-Transkriptase-Test (RTT) weist die Aktivität des für Retroviren spezifischen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) im Blutplasma von virämischen Puten nach. Dieser Test ist nicht spezifisch für LPDV, läßt aber, da die RT des LPDV am besten durch  $Mg^{2+}$  zu aktivieren ist, die RT des REV jedoch nur durch  $Mn^{2+}$ , eine Differenzierung zwischen LPDV und REV zu (YANIV et al., 1979; SCWARZBARD et al., 1980).

Ein indirekter Immunfluoreszenztest (IIFT) wird von PATEL und SHILLETTO (1987b) beschrieben. Unter Verwendung eines aus Kaninchen gewonnenen LPDV-Immunsersums kann das Antigen an peripheren Leukozyten und in Milz- und Thymusschnitten nachgewiesen werden.

Das Forscherteam entwickelte auch einen indirekten ELISA zum Nachweis von LPDV im Blutplasma und einen kompetitiven ELISA zur Bestimmung humoraler Antikörper. Letztere Nachweismethode eignet sich jedoch nicht zur Diagnostik der LPD, da Antikörper bei LPDV-infizierten Puten nur mit Radioimmunopräzipitation und anschließender Elektrophorese des Präzipitats nachgewiesen werden konnten (PATEL und SHILLETTO, 1987c; PATEL und SHILLETTO, 1987d).

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction = PCR) erweitert die diagnostischen Möglichkeiten, mit ihr kann LPDV-Provirus-DNA nachgewiesen werden. SARID et al. (1994b) verwenden hierfür Oligonukleotidprimer die komplementär zu Teilabschnitten des *gag*-Gens sind, DAVIDSON et al. (1996) wählten Primersequenzen aus der LTR-Sequenz.

### **2.2.6 Prophylaxe und Kontrolle der LPD**

Es stehen bislang keine Möglichkeiten der Prophylaxe oder der Kontrolle der LPD zur Verfügung. Zur Bestandssanierung sollte eine Räumung des Bestandes mit anschließender Reinigung und Desinfektion erfolgen. Obwohl experimentell nicht nachvollziehbar, wurde der Wechsel zu einer anderen Putenrasse oder Hybridlinie empfohlen (TIPOLD et al., 1987).

### 2.3 Die Retikuloendotheliose (RE)

Der Begriff Retikuloendotheliose umfaßt verschiedene Krankheitsbilder, verursacht durch Retroviren, die der Gruppe der Retikuloendothelioseviren (REV) zugeordnet werden.

Von WITTER (1997a) und WITTER und FADLY (2003) werden drei Symptomenkomplexe unterschieden:

- 1.) Akute neoplastische Veränderungen von Zellen retikuloendothelialen Ursprungs
- 2.) „Runting disease“-Syndrom
- 3.) chronische neoplastische Veränderungen lymphatischer Zellen und Zellen anderer Gewebe.

Die akuten neoplastischen Veränderungen können nur bei experimentellen Infektionen mit dem REV Stamm T (Twiehaus) beobachtet werden, während die beiden anderen Symptomenkomplexe unter natürlichen Bedingungen vorkommen.

Unter der Bezeichnung „Runting disease“-Syndrom sind verschiedene nichttumoröse Krankheitsbilder, wie Wachstumsdepression, Anämie, Leber- und Milznekrosen, Vergrößerung peripherer Nerven, Thymusatrophie und Atrophie der Bursa Fabricii, Immunsuppression, abnormes Federwachstum und Enteritiden zusammengefaßt.

Die chronischen neoplastischen Veränderungen lymphatischer Zellen und Zellen anderer Gewebe treten erst nach einer längeren Inkubationszeit auf. Bei Puten wurde die chronische lymphoproliferative Form der RE sporadisch auftretend in den USA (ROBINSON und TWIEHAUS, 1974; PAUL et al., 1976; SOLOMON et al., 1976; WITTER und GLASS, 1984), England (McDOUGALL et al., 1978b), Israel (IANCONESCU et al., 1979) und Afrika (OKOYE et al., 1993) beobachtet.

Die Widersprüchlichkeit zwischen der Krankheitsbezeichnung Retikuloendotheliose und den bei natürlichem Infektionsweg auftretenden Krankheitssymptomen erklärt sich bei Betrachtung der ersten Studien zum REV. 1958 isolierten ROBINSON und TWIEHAUS (1974) aus der Leber einer Pute mit lymphatischen Tumoren ein Virus (Stamm T), welches nach Inokulation in Puten- und Hühnerküken bei diesen akute Proliferationen von Zellen retikuloendothelialen Ursprungs verursachte. 90 bis 100% der infizierten Tiere starben 6-21 Tage nach der experimentellen Infektion und aufgrund

der hauptsächlich betroffenen Zellen wurde die Bezeichnung Retikuloendotheliose eingeführt (SEVOIAN et al., 1964; THEILEN et al., 1966).

### 2.3.1 Ätiologie der RE

Die Retikuloendothelioseviren gehören zur Familie der Retroviridae, der Unterfamilie Onkornaviren und werden dem Genus Gammaretrovirus zugeordnet (HUNTER et al., 2000). Sie lassen sich anhand morphologischer und biochemischer Eigenschaften von den Viren des Genus Alpharetrovirus – denen die aviären Leukose-Sarkom-Viren angehören - unterscheiden (MOELLING et al., 1975; HUNTER et al., 2000).

Der REV Stamm T ist ein atypischer Vertreter der Gruppe der REV. Es handelt sich bei diesem Isolat um zwei Viren, von denen das eine sich in Hühner-Embryo-Fibroblasten-Kulturen nicht vermehren kann und deswegen als replikationsdefektes Virus (rdV/rdREV) angesprochen wird, während das andere vermehrungsfähig und somit nicht replikationsdefekt (nrdV/nrdREV) ist (HOELZER et al., 1979; HOELZER et al., 1980).

Das rdV enthält ein endogenes Onkogen (*v-rel*) und ist für die akute, im Tierversuch auslösbare Onkogenität des Stamm T verantwortlich (COHEN et al., 1981; WONG und LAI, 1981). Das nrdV des Stamm T wird auch als sein Helfervirus bzw. als REV-A angesprochen und ist nach längerer Inkubationszeit in der Lage die chronischen neoplastischen Veränderungen bzw. die unter den „Runting-Disease“-Komplex fallenden Krankheitsbilder zu verursachen (WITTER et al., 1981).

Alle nach dem Stamm T isolierten Viren der Gruppe der REV sind nrdV und somit nicht in der Lage eine akute Retikuloendotheliose auszulösen.

Bislang wurden aus verschiedenen Vogelarten über 30 verschiedene Retikuloendothelioseviren isoliert, unter anderem aus Enten das Milznekrose-Virus (SNV) und das Infektiöse-Anämie-Virus (DIAV), aus Hühnerküken das Küken-

Synzytial-Virus (CSV). Zwischen den verschiedenen Isolaten besteht eine enge serologische Verwandtschaft, so daß sie als eine Serogruppe angesprochen werden, innerhalb welcher sie mittels monoklonaler Antikörper in drei Subtypen (A, B und C) einteilbar sind (PURCHASE et al., 1973; CHEN et al., 1987).

Der strukturelle Aufbau der durchschnittlich 100 nm großen REV entspricht der Grundstruktur anderer C-Typ-Retroviren (doppelt vorliegende Einzelstrang-RNA, Kapsid, Matrix, Hülle, Hüllproteine). Elektronenmikroskopisch zeigt sich die Kapsidmembran meist eng mit dem Kapsid verbunden und ähnelt dadurch dem Murinen Leukämie-Virus mehr als den ALSV, bei welchem zwischen Kapsid und Kapsidmembran ein elektronendurchlässiger heller Saum zu erkennen ist (ZEIGEL et al., 1966; MOELLING et al., 1975).

Die Reverse Transkriptase der REV, welche sich strukturell und immunologisch von dem entsprechenden Enzym der aviären Leukose-Sarkom-Viren unterscheidet, ist durch die Zugabe von  $Mn^{2+}$  aktivierbar (MOELLING et al., 1975).

Die Genkarte der REV enthält die ORFs *gag*, *pol* und *env*, diese kodieren für die gruppenspezifischen Antigene, die Virusenzyme und die Hüllproteine. Das Genom der nrdREV ist größer als das Erbmaterial der rdREV. Letzterem fehlt eine größere Region in der *gag-pol*-Region und eine kleinere in der *env*-Region. In der *env*-Sequenz der rdREV findet sich ein zusätzliches Gen mit transformierenden Eigenschaften, das *v-rel*. Da entsprechende Sequenzen in der normalen zellulären DNA vieler aviärer Spezies, u.a. Puten vorkommen (*c-rel*), wird von einer Transduktion dieses Gens aus der Puten-DNA in die Virus-DNA ausgegangen (COHEN et al., 1981; WONG und LAI, 1981; WILHELMSSEN et al., 1984).

### 2.3.2 Epidemiologie der RE

Verschiedene Vogelarten sind für eine natürliche Infektion mit REV empfänglich. Dazu gehören Puten, Hühner, Enten, Gänse, Wachteln und Fasane. Das Erscheinungsbild und die Schwere der Krankheit sind dabei v. a. von dem Virusstamm und der betroffenen Spezies abhängig (PURCHASE et al., 1973; CARLSON et al., 1974; PAUL et al., 1978; DRÉN et al., 1983; DRÉN et al., 1988).

Eine serologische Reihenuntersuchung kommerzieller Hühner- und Putenhaltungen in den USA zeigte einen recht hohen Durchseuchungsgrad bei den Hühnern. Es konnten in etwas über 20% der untersuchten Legehennen-, Broiler- und Broilereltern-Beständen Antikörper gegen REV nachgewiesen werden. In ebenfalls untersuchten privaten Hühnerbeständen lag die Rate der seropositiven Bestände nur bei 2,3%. Ebenfalls deutlich niedriger lag das Ergebnis der Untersuchung von Putenmast- und Puteneltern-Beständen. 4,8 % der Bestände waren seropositiv. Trotz der zahlreichen seropositiven Hühnerbestände spielt die REV als Ursache für klinische Erkrankungen und damit einhergehende wirtschaftliche Verluste nur eine untergeordnete Rolle. Die RE tritt bei Hühnern und auch bei Puten nur sporadisch auf (WITTER et al., 1982).

Die Übertragung kann sowohl horizontal, als auch vertikal erfolgen. Die horizontale Übertragung erfolgt durch direkten Kontakt, Virusübertragung erfolgte nicht bei Abtrennung infizierter Tiere von der Kontrollgruppe durch Maschendraht. Kontaktinfektionen scheinen bei Hühnern selten zu klinischer Erkrankung zu führen, während es bei Puten zur Lymphombildung kommen kann (LAROSE und SEVOIAN, 1965; PETERSON und LEVINE, 1971; PAUL et al., 1977a; BAGUST et al., 1981).

Über die Möglichkeit der REV-Übertragung durch Insekten liegen von MOTHA et al. (1984) und DAVIDSON und MALKINSON (1997) Untersuchungsergebnisse vor. MOTHA konnte aus in virämischen Beständen gefangenen Mücken REV isolieren und experimentell REV durch Mücken übertragen. DAVIDSON und MALKINSON isolierten bis zu 5 Stunden nach der Verfütterung virushaltigen Blutes an Mücken aus

diesen REV in Zellkulturen. Inwieweit diese theoretische Übertragungsmöglichkeit von Bedeutung ist, ist bislang unklar.

Eine vertikale Übertragung der REV ist bei Hühnern und Puten nachgewiesen worden. In einem von WITTER und SALTER (1989) untersuchten Putenelternbestand waren 46% der geprüften Hennen viruspositiv, aber nur 9% gaben während des 6-wöchigen Untersuchungszeitraumes Virus an ihre Nachkommen ab. Dies ergab eine durchschnittliche Übertragungsrate von 1,8%. Die Übertragungsrate wurde nicht durch den Einsatz virushaltigem Spermas erhöht, so daß die Untersucher von einem vernachlässigbaren Einfluß viruspositiver Putenhähne ausgehen. Dem gegenüber steht eine Studie von McDOUGALL et al. (1981), bei der 27,5% der Embryonen und 8,7% der Eintagsküken von mit infiziertem Sperma besamten Putenhennen REV positiv waren. Die Hennen dieses Experiments waren aber im Unterschied zur Untersuchung von WITTER und SALTER (1989) weder virämisch, noch serologisch positiv.

Die REV infizierten Putenküken wurden in Kontakt mit virusfreien Küken gehalten, mit Erreichen der 8. Lebenswoche waren 50% der Kontakttiere serologisch positiv, bis zur 28. Lebenswoche lag die Verlustrate aufgrund tumoröser Veränderungen bei diesen Tieren bei 16% (McDOUGALL et al., 1981).

### **2.3.3 Pathogenese und Immunogenese der RE**

Nach einer REV-Infektion sind die Zielzellen des Virus ebenso wie Art und Verlauf der Krankheit u.a. abhängig von dem Virusstamm, der betroffenen Tierart und dem Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion.

Das Alter der Puten zum Zeitpunkt der Infektion ist entscheidend für die immunologische Reaktion des infizierten Tieres. Vertikal und experimentell infizierte Eintagsküken entwickeln eine tolerante Infektion, sie sind lebenslang virämisch und serologisch negativ. Sie stellen somit ein bedeutendes Virusreservoir dar. Nur wenige Puteneintagsküken, die ab dem ersten Lebenstag in Kontakt mit virämischen Puten gehalten wurden, waren zeitweise virämisch, nahezu alle entwickelten Antikörper.

Keine Virämie war nachweisbar bei in der 4. Lebenswoche infizierten Putenküken, alle waren serologisch positiv.

Die Bildung lymphoider Tumore wird durch die Antikörperbildung nicht verhindert. In jeder der drei Gruppen wurden lymphoide Veränderungen gefunden, die Tiere mit der toleranten Infektion waren dabei am meisten betroffen (PAUL et al., 1977a; McDOUGALL et al., 1980).

#### **2.3.4 Klinisches Bild und Pathologie der RE**

Bei Puten ist das klinische Bild der chronischen lymphoproliferativen Form der RE unspezifisch, die Tiere sind im Entwicklungszustand zurückgeblieben, schwach und ausgezehrt, die Futteraufnahme ist verringert. McDOUGALL et al. (1978b) beschreiben eine Beinschwäche und persistierenden Durchfall zwischen der 8. und 12. Lebenswoche, diesen Symptomen ist ein Anstieg der Mortalität auf 1-2% pro Woche zeitlich zugeordnet. Die Gesamtmortalität wird mit 20% und mehr angegeben. Bei IANCONESCU et al. (1979) wird von einer üblicherweise sporadischen Mortalität ausgegangen, nur in zwei Fällen wurden Gesamtmortalitätswerte von 14 bzw. 25% beobachtet.

Abhängig vom Zeitpunkt der Infektion kann die RE schon im Alter von 6-8 Wochen vorgefunden werden, üblicherweise tritt sie aber erst ab einem Alter von 12-16 Wochen auf (McDOUGALL et al., 1978b; IANCONESCU et al., 1979).

Pathologisch-anatomische Veränderungen sind bei den Puten in der frühen, durch Durchfall und Beinschwäche geprägten Phase der RE nichttumoröser Art. Es finden sich Enteritiden, Perikarditiden und Peritonitiden. Makroskopisch sichtbare proliferative Läsionen treten bei Feldinfektionen ab der 15. Lebenswoche, im Tierversuch schon ab der 11. Lebenswoche auf. Es sind dann in erster Linie Leber, Milz und Intestinum betroffen. Leber und Milz können bis zu 4fach vergrößert sein und helle Infiltrationen oder weiße, 1-5 mm große, runde Tumore aufweisen. Auf dem Darm oder auch intramural finden sich Tumore, eventuell liegen auch Nekrosen der Mukosa vor. Nicht so häufig werden Läsionen in anderen Organen oder Geweben wie Nieren, Herz, Lunge,

Gonaden, Thymus, Bursa Fabricii, Pankreas, Muskel- und Drüsenmagen, Mesenterium, Blutgefäßen, Knochenmark und Nervengewebe gefunden. Die Nervenveränderungen betreffen in erster Linie den N. ischiadicus, der sich verdickt zeigt und seine Querstreifung verliert.

Histologische Untersuchungen zeigen keine pathologischen Veränderungen bei den Puten in der frühen, enteralen Phase. Ab wann pathohistologische Veränderungen auftreten können ist bislang nicht untersucht worden. Bei Tieren mit makroskopischen Läsionen finden sich histologisch diffuse oder herdförmige Infiltrationen mit vorwiegend lymphoblastoiden Zellen, wenigen Lymphozyten, Plasmazellen und Entzündungszellen. Oft prägen hohe Mitoseraten das Bild, teilweise finden sich nekrotische Bereiche. Zum Teil konnte eine massive Verdrängung des normalen Leberparenchyms beobachtet werden, in anderen Organen war dies wesentlich weniger ausgeprägt (PAUL et al., 1976; PAUL et al., 1977a; McDOUGALL et al., 1978b, IANCONESCU et al., 1979).

### **2.3.5 Diagnose der RE**

Für die Diagnose einer REV-Infektion können verschiedene virologische, serologische oder molekularbiologische Verfahren angewendet werden.

Für die Isolierung der nrdREV eignen sich in erster Linie Vollblut, Leukozyten, Milzhomogenisat oder Tumorsuspension aus erkrankten Tieren. Die Proben müssen wegen der Thermolabilität des Virus sehr frisch sein und gekühlt transportiert werden. Als Zellkulturen kommen aviäre Fibroblasten in Frage, häufig werden Hühner-Embryo-Fibroblasten verwendet. Um genügend Virus anzureichern, sollte nach etwa 7 Tagen eine Passage mit Überstand erfolgen. Da meistens nur ein geringgradiger cpE vorliegt, müssen zur Bestätigung der Virusinfektion ergänzende Methoden wie z. B. Immunfluoreszenztest, ELISA oder Komplementfixationstest angewendet werden (FADLY und WITTER, 1998).

Als Methoden für den serologischen Antikörpernachweis können ein indirekter Immunfluoreszenztest, ein indirekter ELISA, ein Agargelpräzipitationstest oder ein Virusneutralisationstest angewendet werden (PURCHASE et al., 1973; IANCONESCU et al., 1977; McDOUGALL et al., 1980; SMITH und WITTER, 1983).

ALY et al. (1993) etablierten die PCR als Möglichkeit REV-Provirus-DNA nachzuweisen. Die ausgewählten Primer liegen auf der LTR-Region des SNV, sind aber trotz gewisser Sequenzunterschiede zwischen den verschiedenen REV-LTRs universell zum Nachweis einer REV-Infektion einsetzbar (DAVIDSON et al., 1995a). Das Amplifikat hat eine Größe von 291 Basenpaaren.

### **2.3.6. Prophylaxe und Kontrolle der RE**

Aufgrund des sporadischen Auftretens der REV und damit auch nur begrenzten wirtschaftlichen Verlusten sind spezielle Techniken zur Prävention und Kontrolle der Krankheit bislang nicht entwickelt worden.

Das Virus ist außerhalb des Wirtes nur begrenzt lebensfähig und nach Ausstallung, Reinigung und Desinfektion des betroffenen Bestandes sind Neuinfektionen nicht zu erwarten.

In Zuchtherden, die aufgrund ihres Wertes nicht vorzeitig aus der Produktion genommen werden sollen, kann versucht werden, die virämischen Tiere zu entdecken und nur diese zu merzen (WITTER und SALTER, 1989; DAVIDSON et al., 1995b).

## 2.4 Die Mareksche Krankheit (MK)

Als Prof. Dr. József Marek 1907 ein mit einer partiellen Lähmung einhergehendes Krankheitsbild bei vier Hähnen beschrieb und dieses als Polyneuritis bezeichnete, konnte er nicht absehen, daß es sich um eine Krankheit handelte, die weltweit wirtschaftlich und wissenschaftlich enorme Bedeutung erlangen sollte. Da neben den Nervenveränderungen auch andere pathologisch-anatomische Veränderungen wie lymphoide Infiltrate verschiedener Organe und Tumore vorgefunden wurden, änderte sich die Bezeichnung des Krankheitsbildes mehrfach. So wurde es u.a. als Neurolymphomatosis gallinarum (PAPPENHEIMER et al., 1929) angesprochen oder auch als neurale Form der Lymphomatose dem Aviären Leukose Komplex zugeordnet (JUNGHERR, 1941).

Mit der zunehmenden Erkenntnis, daß diese Benennungen nicht alle Symptome umfassen, wurde die von Biggs 1961 vorgeschlagene Bezeichnung Mareksche Krankheit von der World Poultry Science Association (WPSA) akzeptiert (BIGGS, 1964).

Als 1967 ein Herpesvirus als ätiologisches Agens identifiziert werden konnte (CHURCHILL und BIGGS, 1967; NAZERIAN und BURMESTER, 1968), machte die weitere Erforschung der MK rasante Fortschritte. So ermöglichte die Entdeckung des Virus der Marekschen Krankheit (MKV) und die kurze Zeit später erfolgte Isolierung des serologisch nahestehenden Puten-Herpesvirus (PHV) bereits nach kurzer Zeit den erfolgreichen Einsatz von Lebendvakzinen (CHURCHILL et al., 1969; KAWAMURA et al., 1969; OKAZAKI et al., 1970; RISPENS et al., 1972a).

Es handelte sich somit um die erste viral bedingte Tumorerkrankung, gegen die erfolgreich vakziniert werden konnte. Diese Tatsache, und auch, daß es sich um ein Herpesvirus mit onkogenem Potential handelt, deren natürlicher Wirt als Tiermodell Vorzüge wie einfache Haltungsbedingungen, leichtes Handling und sehr schnelle Verfügbarkeit größerer Gruppen genetisch homogener Tiere besitzt, machten das MKV für die humane Tumorforschung interessant. Dadurch gehört es zu den am besten erforschten aviären Viren.

### 2.4.1 Ätiologie der MK

Die Mareksche Krankheit wird durch ein aviäres Herpesvirus, das Virus der Marekschen Krankheit (MKV) verursacht.

Es gehört zu einer Gruppe von Herpesviren die eine enge serologische Verwandtschaft aufzeigen und wie folgt eingeteilt werden (VON BÜLOW und BIGGS, 1975 a, b; KALETA, 1990):

- Serotyp 1 - Gallid Herpesvirus 2: pathogene Stämme des Virus der Marekschen Krankheit (MKV) isoliert aus Hühnern und die attenuierten, apathogenen Varianten (MKVatt.)
- Serotyp 2 - Gallid Herpesvirus 3: natürlich vorkommendes apathogenes Virus isoliert aus Hühnern (MKV 2)
- Serotyp 3 - Meleagrid Herpesvirus 1: apathogenes, aus Puten isoliertes Puten-Herpesvirus (PHV).

Aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften, wie dem Fehlen der Infektiösität von aus Zellkulturen gewonnenen zellfreien Viren und ihrem Tropismus zu Lymphozyten wurden MKV, MKV2 und PHV lange Zeit den Gammaherpesvirinae zugeordnet (LEE et al., 1969; ROIZMAN, 1982). Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung der Virusgenome von MKV, MKV2 und PHV wurde jedoch gezeigt, daß die DNA der MKV, MKV2 und des PHV mehr strukturelle Ähnlichkeit mit der DNA der Alphaherpesvirinae als mit der DNA der Gammaherpesvirinae hat (CEBRIAN et al., 1982). Die Anwendung molekularbiologischer Techniken bestätigte diese Befunde. BUCKMASTER et al. (1988) sequenzierten Teile der MKV- und PHV-DNA und verglichen diese Gensequenzen mit den Sequenzen von Varizella Zoster Virus (VZV), Epstein Barr Virus (EBV) und dem humanen Cytomegalie Virus (HCMV). Sie konnten nachweisen, daß die größte Übereinstimmung zwischen den Gensequenzen von MKV und PHV und denen des Alpha-Herpesvirus VZV besteht. PRINGEL (1999) ordnet MKV, MKV2 und PHV deshalb den Alphaherpesvirinae zu, eine Einstufung die auch im 7. Report des internationalen Komitees für Virustaxonomie ihre Bestätigung findet (MINSON et al., 2000).

Untersuchungen von BIGGS und MILNE (1972) zeigten eine Beziehung zwischen Plaquemorphologie und Pathogenität innerhalb der Gruppe der Viren der Marekschen Krankheit. Demnach kann folgende Einteilung vorgenommen werden:

- kleine Plaques - apathogene MKV des Serotyps 2
- mittlere Plaques - pathogene MKV des Serotyps 1
- große Plaques - PHV (Serotyp 3) und die apathogenen, attenuierten Varianten des Serotyps 1.

#### **2.4.1.1 Morphologie der MKV, MKV2 und PHV**

Wie alle Herpesviren besitzen das MKV, MKV2 und PHV eine lineare Doppelstrang-DNA, welche sich spiralförmig um eine fibrilläre Spindel aus Proteinen windet und mit dieser den Innenkörper (Viruskern, Core) bildet. Der Innenkörper wird von einem ikosaedrischen Kapsid bestehend aus 162 zylindrischen Kapsomeren umgeben und bildet mit ihm das sogenannte Nukleokapsid (NAZERIAN und BURMESTER, 1968). Dieses hat einen Durchmesser von 90-100 nm und wird vom Integument, bestehend aus asymmetrisch angeordnetem, globulärem Protein, umhüllt (OKADA et al., 1972).

Um Nukleokapsid und Integument befindet sich beim kompletten Virus eine zweischichtige Membran, die Lipid-, Kohlenhydrat- und Proteinanteile enthält. Auf der Oberfläche dieser Hülle (Envelope) befinden sich Glykoproteine, welche bei der Infektiosität und Antigenität des Virus eine wichtige Rolle übernehmen.

Die Struktur der MKV-, MKV2- und PHV-Genome entspricht der Genomstruktur von Herpes Simplex Virus (HSV) Serotyp 1 und 2. Es liegen eine lange und eine kurze Nukleinsäuresequenz (unique long/ $U_L$ , unique short/ $U_S$ ) vor, an deren Enden sich invertierte Sequenzwiederholungen (inverted repeats) befinden. Diese werden entsprechend ihrer Position als innere oder äußere Wiederholung an den „Unique“-Regionen angesprochen (terminal repeat long/ $TR_L$  bzw. short/ $TR_S$  und internal repeat long/ $IR_L$  bzw. short/ $IR_S$ ) (CEBRIAN et al., 1982; ROSS et al. 1983; FUKUCHI et al., 1984). Das virale Genom ist in der Lage für nahezu 80 Proteine zu kodieren. Die

meisten dieser Proteine stimmen bei allen drei Serotypen überein und haben Entsprechungen in den HSV. Einzigartig für MKV sind die Gensequenzen in der IR<sub>L</sub>- und IR<sub>S</sub>-Region, von denen manche nur bei onkogenen MKV vorhanden sind (VENUGOPAL, 2000; KINGHAM et al., 2001).

Restriktionsenzymanalysen zeigten deutliche Unterschiede in den durch die elektrophoretische Auftrennung erhaltenen Mustern der Genomfragmente der drei Serotypen (KASCHKA-DIERICH et al., 1979; HIRAI et al., 1979; ROSS et al., 1983; HIRAI et al., 1986). Es wurden Restriktionskarten für jeden Serotyp erstellt (FUKUCHI et al., 1984; IGARASHI et al., 1987; ONO et al., 1992).

Da Serienpassagen des MKV in Zellkulturen mit dem Verlust der Onkogenität einhergehen (NAZERIAN, 1970), wurden die Restriktionsenzymmuster niedriger und hoher Passagezahlen verschiedener Virusstämme verglichen. Dabei zeigte sich, daß das Restriktionsenzymmuster des Enzyms BamHI bei niedriger Passagezahl der MKV die Fragmente BamHI-D und BamHI-H enthält, diese aber bei den attenuierten MKV fehlen (HIRAI et al., 1981; ROSS et al., 1983; SILVA und WITTER, 1985). Diese für nichtattenuierte Stämme spezifischen Fragmente ähneln allerdings Fragmenten, die bei den attenuierten Varianten vorkommen und als BamHI-Dhet und BamHI-Hhet angesprochen werden (HIRAI et al., 1984).

BamHI-Dhet und BamHI-Hhet variieren in ihrer Größe und genauere Analysen dieser Gensequenzen durch MAOTANI et al. (1986) und KANAMORI et al. (1986) ergaben, daß dieses Phänomen durch die variierende Anzahl einer sich wiederholenden, 132 Basenpaar langen Sequenz (132-bp repeat region) verursacht wird. Diese 132-bp repeat region wurde auch in den Fragmenten BamHI-D und -H der nichtattenuierten MKV nachgewiesen, dort liegt sie ein, zwei oder dreimal vor, während sie bei den attenuierten Varianten vielfach vorkommt. Längere Zeit wurde davon ausgegangen, daß auch bei dem minimal onkogenen MKV-Stamm CVI 988 mehr als drei Kopien der 132-bp repeat region vorliegen. Untersuchungen von HOOFT van IDDEKINGE et al. (1999) zeigen jedoch, daß dies nur für die attenuierten Impfstämme zutrifft, das ursprünglich isolierte Virus hat 2 Kopien der repeat region.

IGARASHI et al. (1987) ermittelten homologe Gensequenzen bei MKV und PHV, konnten aber beim PHV kein Äquivalent zu den BamHI-D und -H Fragmenten des MKV finden.

BRADLEY et al. (1989a, b) untersuchten das BamHI-H Fragment hinsichtlich seines tumorinduzierenden Potentials und stellten für die 132-bp repeat region eine hohe Transkriptionsaktivität fest, wobei zwischen onkogenen und nichtonkogenen MKV Unterschiede hinsichtlich der Leserichtung bestehen. Weiterhin konnten sie eine durch diese Gensequenz bei onkogenen, nicht aber bei attenuierten, MKV produzierte RNA nachweisen.

Trotz vieler Bemühungen ist das molekularbiologische Prinzip der Tumorbildung noch nicht geklärt. Außer der oben aufgeführten Gensequenz sind noch andere Regionen der MKV-DNA von Veränderungen durch die Attenuierung betroffen, z.B. charakterisierten WILSON und COUSSENS (1992) Veränderungen innerhalb des BamHI-L Fragmentes und WILSON et al. (1994) entdeckten bei den attenuierten Varianten eine deutlich herabgesetzte Bildung des A-Antigens.

In Zusammenhang mit der Onkogenität wird über die potentielle Rolle verschiedener Gensequenzen diskutiert. Es wird vermutet, daß die Lymphombildung durch MKV nicht durch ein einzelnes Onkogen verursacht wird, sondern daß verschiedene Gene die Zelltransformation auslösen (BIGGS, 1997b; VENUGOPAL, 2000). Zu den am besten erforschten Genen und Proteinen gehören die BamHI-H-Gen-Familie, der MKV-Phosphoprotein-Komplex (pp38-Komplex), das ICP4 (infected cell protein 4) und das MKV EcoRI-Q-Gen (meq).

Die BamHI-H-Gen-Familie setzt sich aus drei 1,8 kb, 3,0 kb und 3,8 kb langen Sequenzen zusammen, welche um die 132-bp repeat region herum liegen. Die Wichtigkeit der BamHI-H-Region wurde bereits mit der durch die Attenuierung von MKV induzierten Veränderung der 132-bp repeat region deutlich. Es wird vermutet, daß die Vergrößerung der 132-bp repeat region direkten Einfluß auf die durch die BamHI-H-Gen-Familie kodierten Kopien hat. Diese nehmen Einfluß auf die Wachstumskontrolle von MKV induzierten lymphoblastoiden Zelllinien und scheinen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Tumorzellen zu haben (VENUGOPAL, 2000).

Bei dem pp 38-Komplex handelt es sich um drei virusspezifische, 41, 38 und 24 kDa schwere phosphorylierte Polypeptide, welche in transformierten und produktiven MKV-infizierten Zellen nachgewiesen wurden (NAITO et al., 1986, CUI et al., 1991). Das diese Proteine kodierende Gen liegt - teilweise überlappend mit der 1,8-kb BamHI-H-Gen-Familie - im Bereich des Übergangs der U<sub>L</sub>- und IR<sub>L</sub>-Region, wird jedoch in entgegengesetzter Richtung gelesen (CHEN et al., 1992). Es wurde lange Zeit als MKV-spezifisch und tumorassoziiert angesehen, seit jedoch durch ONO et al. (1994) und SMITH et al. (1995) bei MKV2 und PHV dem pp 38-Gen sehr ähnliche Gensequenzen nachgewiesen wurden, ist diese Hypothese umstritten. Es wird inzwischen vermutet, daß die Funktion des pp 38-Komplex mehr im Bereich der lytischen Infektion lymphatischer Zellen als in einem transformierenden Einfluß auf diese zu sehen ist. Ungeachtet dessen ist es nachgewiesen, daß eine Hemmung des pp 38-Gens zu einer Hemmung der Proliferation lymphoblastoider Zelllinien führt (VENUGOPAL, 2000).

ICP4 ist ein im Zellkern lokalisiertes virales Phosphoprotein, dessen Gen im Bam-HI-A-Fragment im Bereich der IR<sub>S</sub>-Region liegt. Das MKV ICP4 hat eine ähnliche Struktur wie die ICP4 anderer Herpesviren und aktiviert einige MKV-Gene, wie z.B. das pp 38-Gen. Da ICP4-Kopien in latent mit MKV infizierten sowie in lymphoblastoiden Zelllinien gefunden wurden und eine Hemmung des ICP4 zu einer Hemmung der Proliferation lymphoblastoider Zelllinien führt, wird vermutet, daß ICP4 eine wichtige Rolle hinsichtlich der Latenz von MKV und der Transformation von mit MKV infizierten Zellen spielt (ANDERSON et al., 1992; VENUGOPAL, 2000).

Eines der interessantesten Gene hinsichtlich potentieller Onkogenität ist meq. Das durch meq codierte bZIP (basic region leucine zipper protein) besitzt Transkriptionsaktivität und weist deutliche strukturelle Ähnlichkeit mit der Struktur der durch die jun/fos-Onkogen-Familie codierten Proteine auf (QIAN et al., 1995, CALNEK, 1998). Das meq-Gen liegt innerhalb der BamHI-I<sub>2</sub> und -L-Fragmente und wurde zuerst nur in transformierten oder latent mit MKV infizierten Zellen gefunden (SUGAYA et al., 1990; JONES et al., 1992). Durch die Entdeckung, daß meq apoptotische Prozesse zu blockieren vermag, wird die Ansicht unterstützt, daß es sich um einen wichtigen Kandidaten auf der Suche nach den transformierenden Genen handelt (LIU et al. 1998). Allerdings fanden PENG et al. (1995) auch in attenuierten CVI 988 das meq-Gen und

schlossen daraus, daß meq alleine nicht in der Lage ist zu einer Zelltransformation zu führen, sondern daß es mit weiteren Genen interagieren muß. LEE et al. (2000) wiesen innerhalb der meq ORF von CVI 988 eine 178 bp lange Sequenz nach, die sie bei den meq-Genen onkogener Stämme nicht fanden. Ihre Hypothese, daß diese Insertion die Ursache der fehlenden Onkogenität der CVI 988 ist, wurde durch weitere Arbeiten dieser Forschergruppe widerlegt, in denen sie das meq-Gen mit der zusätzlichen Sequenz (L-meq) auch nach einer Infektion mit den onkogenen Viren RB1B und Md5 nachwiesen. Desweiteren konnten sie in mit attenuierten JM und CVI 988/R6 (attenuierter Vakzinestamm) infizierten Hühnern sowohl meq als auch L-meq nachweisen (CHANG et al., 2002). Die Funktion der zusätzlichen Sequenz bleibt weiterhin unklar, zumal ein durch sie induziertes Protein bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

#### **2.4.1.2 Virusspezifische Antigene der MKV, MKV2 und PHV**

Besonders in den letzten 10 Jahren wurden viele molekularbiologische Studien über MKV- und auch PHV-induzierte Proteine angefertigt. Schon 1968 fanden CHUBB und CHURCHILL mittels Agargelpräzipitationstest (AGPT) sechs Antigene, von denen drei regelmäßig gefunden wurden und die Bezeichnungen A-, B- und C-Antigen erhielten. Das A-Antigen ist löslich und wurde im Zellkulturüberstand und bei MKV-infizierten Tieren im Federfollikelepithel (FFE) und Blutserum nachgewiesen (ISFORT et al., 1986a). Es ist ein Glykoprotein (57-65 kDa), im Zytoplasma und an der Zellmembran zu finden und gilt als das wichtigste Antigen zum Nachweis von Serumantikörpern mittels AGPT. Als identisch mit dem A-Antigen wurden die von CHEN und PURCHASE (1970) beschriebenen frühen und späten Membran-Antigene eingeordnet (IKUTA et al., 1983). Die Bildung des A-Antigens wird durch die Attenuierung signifikant reduziert (WILSON et al., 1994). Da es aber auch onkogene, A-Antigen-negative MKV gibt, und das A-Antigen auch von MKV2 und PHV gebildet wird, kann es nicht als Marker für Onkogenität angesehen werden (VAN ZAANE et al., 1982a). Das B-Antigen ist ein zellassoziertes, in Zellmembran und Zytoplasma MKV-, MKV2- und PHV-infizierter Zellen vorkommendes Glykoprotein (ROSS et al., 1975; HIRAI et

al., 1986). Durch die Anwendung monoklonaler Antikörper konnten drei glykolysierte Formen und zwar gp100, gp 60 und gp49 nachgewiesen werden, wobei die beiden letzteren als Spaltprodukte des gp100 angesehen werden (ISFORT et al., 1986b; NIIKURA et al., 1992; SITHOLE et al., 1988). Antigen B induziert die Bildung neutralisierender Antikörper (IKUTA et al., 1984; ONO et al., 1985) und ist maßgeblich bei der Ausbildung der antiviralen Immunität beteiligt. NAZERIAN et al. (1992) beschrieben den durch eine rekombinante Hühnerpockenvakzine, welche das B-Antigen präsentiert, erreichten Schutz vor der MK. Weitere MKV-induzierte Antigene, die mit MKV2 und PHV Kreuzreaktionen aufweisen, sind ein DNA bindendes Antigen (NAKAJIMA et al., 1986) und ein virusspezifisches Polypeptid (IKUTA et al., 1984). Das lange Zeit als wichtiges Antigen in der Antitumor-Immunreaktion angesehene MATSA (Marek's disease tumor-associated surface antigen) (WITTER et al., 1975), ist nicht wie anfangs angenommen ein virusspezifisches, sondern ein wirtsspezifisches Antigen, welches auch auf Milzzellen von mit PHV- und MKV2-infizierten Hühnern und auf aktivierten T-Zellen nichtinfizierter Hühner nachweisbar ist (CHAT und CALNEK, 1978; McCOLL et al., 1987). Ein weiteres an der Oberfläche von MKV induzierten Lymphomzellen gefundenes Antigen ist AV 37. Dieses scheint die Erkennbarkeit der MKV-infizierten Zellen durch zytotoxische Lymphozyten und andere Zellen des Immunsystems negativ zu beeinflussen (BURGESS et al., 1996).

#### **2.4.1.3 Pathotypen des MKV**

Die Pathogenität der einzelnen Stämme des MKV wird anhand ihres onkogenen Potentials gemessen. Dabei werden genetische Empfänglichkeit und Impfstatus der betroffenen Hühner als wichtige Kriterien zur Einteilung mit herangezogen (Tabelle 1). Virusstämme des Serotyp 1, die bei ungeimpften, genetisch resistenten bzw. mit PHV-Vakzine geimpften, genetisch empfänglichen Hühnern die MK auslösen, werden als sehr hoch onkogene (+++ bzw. very virulent) MKV angesprochen. Hoch onkogene (++ bzw. virulent) Varianten verursachen eine hohe Lymphomrate bei genetisch empfänglichen Hühnern, genetisch resistente Tiere erkranken nicht oder nur zu einem geringen Prozentsatz. Als gering onkogen (+ bzw. mild) werden MKV angesprochen,

die selten Tumore oder auch nur Nervenläsionen verursachen (WITTER, 1983; SCHAT, 1985, WITTER und SCHAT, 2003).

Eine etwas andere Nomenklatur der Pathotypen findet sich bei WITTER (1997b). Er vergleicht die Häufigkeit des Auftretens der MK nach Infektion genetisch empfänglicher Hühner mit verschiedenen MKV-Isolaten mit der Häufigkeit des Auftretens der MK nach Infektion mit dem hoch onkogenen MKV-Stamm JM. Die Versuchstiere waren entweder ungeimpft, mit PHV oder mit PHV und SB-1 (Serotyp 2) geimpft. Desweiteren beschreibt er einen neuen Pathotyp, den er als very virulent + bezeichnet, da seine Onkogenität über der von den sehr hoch onkogenen Stämmen liegt.

In den letzten Jahrzehnten konnte periodisch - meist in Zusammenhang mit der Einführung neuer Impfstoffe - eine Steigerung der Pathogenität der MKV und eine Veränderung des Krankheitsbildes festgestellt werden. WITTER (1997c) sieht dieses Phänomen in Zusammenhang mit dem Auftreten neuer Pathotypen und vermutet, daß das MKV aufgrund von Mutationen zu höherer Pathogenität gelangte. Für die Mutationsfähigkeit der MKV spricht ihre nach Serienpassagen in Zellkulturen erfolgende Attenuierung. Diese erfolgt schrittweise, über eine von Virusstamm zu Virusstamm unterschiedliche Anzahl von Passagen und führt zu verschiedenen biologischen Veränderungen. Dies sind z.B. der Verlust des A-Antigens, eine steigende Replikationsrate in vitro, eine sinkende Replikationsrate in vivo, eine reduzierte zytolytische Infektion in vivo, der Verlust der Fähigkeit zur Replikation in Lymphozyten, sowie eine verminderte Ausscheidung über das Federfollikelepithel (WITTER, 2002). Die Ursachen für die unterschiedliche Pathogenität der MKV sind weiterhin unklar. Diskutiert wird das Vorliegen einer Gensequenz mit Promotoreigenschaft, welche das zelluläre onc-Gen stimuliert und bei den verschiedenen Pathotypen unterschiedlich stark ausgeprägt sein soll (SCHAT, 1985). Eine andere Erklärung legt die bei den sehr hoch onkogenen Stämmen stärker ausgeprägte lytische Infektion und Atrophie von Bursa und Thymus und die damit verbundene Immunsuppression zugrunde (SCHAT et al., 1982; DAVIDSON et al., 1988; CALNEK et al., 1998).

In praxi erforderte das Auftreten der neuen Virusstämme den Einsatz neuer Vakzinationsprogramme (BERTRAM, 1999).

Bisher ist mit labortechnischen Methoden keine Differenzierung der verschiedenen Pathotypen möglich. VAN ZAANE et al. (1982b) versuchten dies durch den Vergleich der virusinduzierten Polypeptide und konnten als einzigen Unterschied bei dem MKV-Stamm GA kein Glykoprotein 4 (gp 4) nachweisen.

**Tabelle 1: Einteilung repräsentativer MKV-Isolate anhand ihrer Onkogenität (nach SCHAT, 1985, WITTER, 1997b und WITTER und SCHAT 2003)**

Onkogenität	Pathotypbezeichnung	Repräsentative Isolate	Referenz der Isolate	Häufigkeit des Auftretens der MK ist	in genetisch empfänglichen Hühnern geimpft mit
++++	sehr hoch onkogen +	584A, 584B, 648A	WITTER, 1997b	> Md 5	PHV und SB-1
+++	sehr hoch onkogen	Md 5, Md 11, Ala-8,Ala-9, RB-1B	WITTER et al., 1980; EIDSON et al., 1981; SCHAT et al., 1982	> JM; ----- = Md 5	PHV ----- PHV und SB-1
++	hoch onkogen	JM HPRS-16 GA	SEVOIAN et al., 1962; PURCHASE und BIGGS, 1967; EIDSON und SCHMITTLE, 1968	= JM	PHV
+/-	gering onkogen	CVI 988 CU-2	RISPENS et al., 1972; SMITH und CALNEK, 1973	< JM	ungeimpft

### 2.4.2 Epidemiologie der MK

Der natürliche Wirt des MKV ist das Haushuhn. Die MK ist weltweit verbreitet und zählt zu den wirtschaftlich bedeutendsten Krankheiten der Hühner.

Pathologische Läsionen, ähnlich denen von Hühnern mit MK, wurden gelegentlich u.a. in Enten, Gänsen, Eulen, Fasanen, Wachteln, Rebhühnern und Puten vorgefunden. Der ätiologische Nachweis für das Vorliegen einer MKV-Infektion konnte jedoch nur bei Wachteln und Puten erbracht werden (JUNGHERR, 1939; HALLIWELL, 1971; DUTTON et al., 1973; KALETA; 1975; POWELL and PAYNE, 1993; COUDERT et al., 1995).

Zellfreies, infektiöses MKV wird mit den Zellen des Federfollikelepithels (FFE) der Hühner an die Umwelt abgegeben (CALNEK et al., 1970; NAZERIAN und WITTER, 1970) und ist im Staub bei Raumtemperatur (27°C) bis zu 30 Wochen und bei 4°C bis zu 10 Jahre infektiös (CARROZZA et al., 1973; SCHAT, 1985). Eine Verbreitung des Virus ist somit durch die Luft und durch verschiedene belebte und unbelebte Vektoren, wie Menschen, Ungeziefer (z. B. Getreideschimmelkäfer), Transportbehälter, Geräte und Fahrzeuge möglich (WERNER, 1988), die natürliche Infektion erfolgt horizontal aerogen (COLWELL und SCHMITTLE, 1968).

### 2.4.3 Pathogenese der MK beim Haushuhn

Bei einer natürlichen Infektion wird das MKV im Atmungstrakt vermutlich von Makrophagen aufgenommen und gelangt in diesen in die lymphatischen Organe. Dort kommt es zu einer akuten, zytolytischen Infektion vor allem der B-Lymphozyten, mit der Folge einer Bursa Fabricii- und Thymusatrophie (PAYNE und RENNIE, 1973; SHEK et al., 1983). Das Ausmaß der Atrophie, deren Gipfel zwischen dem 5. und 7. Tag p.i. liegt, ist abhängig von der Pathogenität des infizierenden MKV und kann bei erheblicher Gewebeerstörung zum Tod des Tieres führen. In jedem Fall kommt es zu einer vorübergehenden Immunsuppression. Durch die ebenfalls stattfindenden

Retikulumzellhyperplasien in den lymphatischen Geweben kommt es zu einer Vergrößerung der Milz.

Etwa 7 Tage p.i. treten zellvermittelte Immunreaktionen auf, aufgrund derer die zytolytische, produktive Phase von einer latenten Phase abgelöst wird (CALNEK et al., 1984). Die meisten latent infizierten Zellen sind aktivierte T-Lymphozyten, deren Aktivierung eine Reaktion auf die zytolytische Infektion der B-Lymphozyten und Voraussetzung für ihre Infektion ist. Die latente Infektion kann lebenslang andauern (WITTER et al., 1971).

Mit dem Beginn der latenten Phase kommt es bei Infektionen mit schwach bis mittelgradig onkogenen MKV bzw. bei genetisch resistenten Hühnern zu einer Regeneration des geschädigten lymphatischen Gewebes, während bei Infektionen mit onkogeneren Stämmen bzw. bei genetisch empfänglichen Hühnern die Schäden und ihre immunsuppressiven Auswirkungen zum Teil bestehen bleiben (CALNEK et al., 1998).

Ab dem 5. Tag p.i. entwickelt sich eine zellassozierte Virämie mit einem Gipfel am 8. Tag p.i., durch welche das Virus in die verschiedenen Organe gelangt. In den parenchymatösen Organen kann es zu einer geringgradigen restriktiv produktiven Infektion der Gewebezellen mit deren Lysis oder der Bildung von intranukleären Einschlußkörperchen kommen (PAYNE, 1976).

Die latent infizierten T-Lymphozyten können nahezu jederzeit transformieren, oft folgt die damit verbundene Bildung von Neoplasien aber einer zweiten zytolytischen Infektion der lymphatischen Organe, die durch verschiedene Faktoren ausgelöst werden kann. Zu diesen Faktoren gehören unter anderem Stress durch Umstallung, Beginn der Legetätigkeit oder Erkrankungen wie z.B. Kokzidiose oder Infektiöse Kükenanämie. Neben der Bildung von Lymphomen kommt es zu einer permanenten Immunsuppression (GROSS, 1972; PAYNE, 1985; SCHAT, 1985; CALNEK und WITTER, 1997).

Etwa 14 Tage p.i. wird in den Zellen des FFE zellfreies, komplettes und hoch infektiöses MKV gebildet und mit abgestorbenen Epithelzellen an die Umgebung

abgegeben. Diese produktive Infektion kann lebenslang andauern (CALNEK et al., 1970; CALNEK et al., 1998; PAYNE, 1976).

Faktoren die die Pathogenese beeinflussen sind, neben der bereits erwähnten genetisch bedingten Empfänglichkeit - es wurden bisher zwei Genloci identifiziert - das Geschlecht der Tiere und eine altersbedingte Resistenz. So sind weibliche Tiere für eine Erkrankung empfänglicher als männliche und die Erkrankungswahrscheinlichkeit nimmt mit zunehmenden Alter der Tiere zum Zeitpunkt der Infektion ab (WITTER et al., 1973; POWELL, 1985).

#### **2.4.4 Klinisches Bild und Pathologie der MK beim Haushuhn**

Bei der MK des Huhnes werden vier verschiedene Verlaufsformen unterschieden. Die klassische Form ist gekennzeichnet durch Nervenveränderungen und damit einhergehender Lähmung der Tiere, während sich bei der akuten Form multiple Lymphome in den viszerale Organen finden (BIGGS et al., 1965). Als transiente Paralyse wird die dritte, selten vorkommende Form, die als akute Enzephalitis auftritt, bezeichnet (SWAYNE et al., 1989, GIMENO et al., 1999). Als vierte Form gilt der subklinische Verlauf (KALETA, 1981).

Klassischer und akuter Verlauf können auch als Mischform auftreten.

Nahezu jeder Nerv kann bei der klassischen Form betroffen sein, oft ist einer oder sind beide N. ischiadici involviert, wodurch das Huhn anfangs lahmt und einen unsicheren Gang aufweist, im Voranschreiten des Prozesses eine vollständige Lähmung des bzw. der Beine auftreten kann. Auch ein oder beide Flügel können gelähmt herabhängen und bei einer Beeinträchtigung der motorischen Halsnerven werden tief gehaltener Kopf und auch Torticollis beobachtet (PURCHASE, 1985).

Unspezifische Symptome wie Abmagerung, Anämie, reduzierte Futteraufnahme und auch Durchfall werden bei der akuten Form beobachtet (CALNEK und WITTER, 1997).

In Fällen, bei denen die Iris betroffen ist, kann die Sehfähigkeit der Tiere aufgrund der herabgesetzten Akkomodationsfähigkeit stark reduziert sein (FRITZSCHE, 1933; CALNEK und WITTER, 1997).

Die Morbidität und Mortalität entsprechen einander, nur gelegentlich kann ein klinisch erkranktes Tier genesen (BIGGS und PAYNE, 1967). Bei der klassischen Form liegt die Mortalitätsrate bei bis zu 15%, meist jedoch darunter, während sie bei der akuten Form deutlich höhere Werte von bis zu 70% erreichen kann (POWELL und PAYNE, 1993).

Die pathologisch-anatomischen Veränderungen der Nerven sind bis zu dreifache Umfangszunahme, entweder nodulär oder entlang des gesamten Nerven. Damit verbunden ist ein Verschwinden der nerventypischen Querstreifung und eventuell eine gräuliche oder gelbliche Verfärbung (PAYNE, 1985).

Lymphome treten in einem oder mehreren Organen auf, betroffen sind v.a. Leber, Ovar, Niere, Milz, Drüsenmagen, Lunge, Herz, Pankreas, Nebenniere, Darm, Mesenterium, aber auch Haut und Skelettmuskulatur können entsprechende Läsionen aufweisen. Die Organe sind teilweise stark vergrößert, es finden sich diffuse gräuliche Veränderungen und auch derbe, knotige, meist weißliche Tumore unterschiedlicher Größe. Die Veränderungen der Bursa Fabricii und des Thymus treten i.d.R. als eine Atrophie des Organs auf (BEYER et al., 1980).

Das histologische Bild der Lymphome ist meist von pleomorphem Charakter, es finden sich hauptsächlich Lymphozyten und Lymphoblasten, desweiteren Retikulumzellen und Makrophagen, gelegentlich auch Granulozyten und Plasmazellen. 60 bis 80% der Lymphomzellen sind T-Lymphozyten, etwa 10-20% sind B-Lymphozyten. Auch hohe Mitoseraten können beobachtet werden (PAYNE und BIGGS 1967; PAYNE, 1985, BEYER und WERNER, 1990). Sollten eher monomorphe Infiltrate vorliegen, bestehen sie aus Lymphozyten und Lymphoblasten (BEYER et al., 1980).

Nach PAYNE und BIGGS (1967) können die Nervenläsionen histologisch in drei Gruppen unterteilt werden. Typ-A-Läsionen haben lymphoproliferativen Charakter, es finden sich zahlreiche Lymphoblasten und Lymphozyten verschiedener Größe, auch

Retikulumzellen und Makrophagen können vorhanden sein. Häufig sind sogenannte „MK-Zellen“ zu erkennen, bei denen es sich um degenerierte Lymphoblasten handelt, und eventuell sind Demyelinisierung und Proliferation der Schwannschen Zellen zu beobachten. Typ-B-Läsionen sind durch ein interneuritisches Ödem und geringgradige Infiltration mit vorwiegend kleinen Lymphozyten und Plasmazellen und Demyelinisierung geprägt. Typ-C-Läsionen zeigen kleine Areale mit verstreuten Lymphozyten und Plasmazellen (PAYNE und BIGGS 1967; PAYNE, 1972; PAYNE, 1985).

#### **2.4.5 Diagnose der MK**

Zur Isolierung des MKV können Blutleukozyten, Tumor- und andere Gewebezellen verwendet werden. Die Proben sollten spätestens 24 Stunden nach der Entnahme auf empfängliche Zellkulturen verbracht werden, da sonst die zellgebundenen MKV mit den Wirtszellen absterben. Sehr gut eignen sich für die primäre Isolierung Hühner-Nierenzell- (HNZ) und Enten-Embryo-Fibroblasten-Kulturen (EEF). MKV-typische Veränderungen sind in HNZ 5-8 Tage, in EEF 10-14 Tage nach der Beimpfung mit virushaltigem Untersuchungsmaterial zu erwarten (SHARMA, 1998).

Um welchen Serotyp es sich handelt, läßt sich anhand des morphologischen Erscheinungsbildes des cpE beurteilen (WITTER, 1983; SCHAT, 1985), sicherer ist aber die Identifizierung des Erregers durch weitere labortechnische Methoden. Hierzu eignen sich z.B. der Immunfluoreszenztest mit monoklonalen Antikörpern, der Agargelpräzipitationstest, in-situ-Hybridisationen oder die PCR (LEE et al., 1983; ZHU et al., 1992; SHARMA, 1998).

Die PCR eignet sich auch sehr gut zum direkten Nachweis von MKV-DNA in Gewebe, Blutproben und Federkielen verdächtiger Tiere, als spezifische Primer für den Serotyp 1 eignen sich die 132-bp repeat region flankierenden Sequenzen. Dies ermöglicht auch eine Unterscheidung zwischen onkogenen und attenuierten Stämmen des MKV, da bei letzteren die Wiederholungssequenz mehr als dreimal vorliegt. Dadurch würden deren

Amplifikate weitaus größer bzw. mehrere verschiedener Größe vorliegen als bei onkogenen Stämmen des MKV, deren erwartete Amplifikationsprodukte eine Größe von 185, 317 oder 449 Basenpaaren haben (SILVA, 1992; ZHU et al., 1992; KOZDRUN et al., 2001; DAVIDSON und BORENSHTAIN, 2002a). Andere von ZHU et al. (1992) beschriebene Primer stammen aus der Sequenz des A-Antigens. Mit diesen kann jedoch nur festgestellt werden, ob Serotyp 1 MKV-DNA vorliegt, nicht aber ob es sich um einen onkogenen Stamm handelt oder eine Infektion mit attenuierten Stämmen vorliegt.

Serologisch lassen sich Antikörper gegen MKV mittels Agargelpräzipitationstest, Immunfluoreszenztest, ELISA und Virusneutralisationstest nachweisen (SHARMA, 1998).

#### **2.4.6 Prophylaxe und Kontrolle der MK**

Eine über allgemeine Hygiene- und Sicherheitsmaßnahmen sicher aufrecht zu haltende Infektionsprävention ist beim Huhn aufgrund der weiten Verbreitung und großen Tenazität des Virus und seiner leichten Übertragbarkeit kaum zu erreichen.

Um die Infektion der Küken zu einem frühen Zeitpunkt zu vermeiden, sollte die Aufzuchtshygiene optimiert, der Kontakt zu älteren Hühnern und uneingeschränkter Personenverkehr vermieden werden.

Zusätzlich erfolgt bei den Legehennenküken und teilweise auch bei den Broilerküken am ersten Lebenstag eine Vakzination. Für die Impfung stehen mono-, bi- oder trivalente Vakzinen zur Verfügung, sie können entweder PHV, attenuierte MKV oder MKV2 enthalten (WITTER, 1985).

In Deutschland wird üblicherweise mit einer Kombination aus PHV, Stamm FC 126 oder ähnliche, und dem attenuierten MKV-Stamm CVI 988 am ersten Lebenstag geimpft. Um vermehrt auftretenden MK-Impfdurchbrüchen zu begegnen, wird in einigen Regionen zwischen dem 8. und 10. Lebenstag eine monovalente

Wiederholungsimpfung mit PHV oder CVI 988 durchgeführt. Der Erfolg ist vielversprechend, der protektive Mechanismus aber unklar (BERTRAM, 1999).

## **2.5 Die MK bei Puten**

Einige Forscher haben gezeigt, daß experimentell mit MKV infizierte Puten an der MK erkrankten und sich v.a. in Lebern und Milzen Lymphome bildeten. Andere Organe und die peripheren Nerven waren unregelmäßig betroffen (SEVOIAN et al., 1963; WITTER et al., 1970; WITTER et al., 1974; PAUL et al., 1977b; ELMUBARAK et al., 1981; POWELL et al., 1984). Desweiteren liegen Berichte über spontane Erkrankungen nach MKV-Feldinfektionen bei Puten in Frankreich, Israel, Polen, Italien und Schottland (COUDERT et al., 1995; DAVIDSON et al., 1996; KOZDRUN, pers. Mitteilung, ROSATI et al., 1999; PENNYCOTT und VENUGOPAL, 2002) vor.

### **2.5.1 Experimentelle Infektionen von Puten mit aus Hühnern bzw. Laborputen isolierten MKV**

Die erste Mitteilung über einen erfolgreichen Übertragungsversuch stammt von SEVOIAN et al. (1963). Sie infizierten Küken zweier nicht näher beschriebener Putenlinien mit dem MKV-Stamm JM, indem sie Leber- und Gonadengewebe infizierter Hühner als zellhaltiges und zellfreies Material inokulierten. 6 Wochen p.i. entwickelten die Versuchstiere Lymphome in Herz, Leber, Milz und Niere. Histologisch fanden sich winzige Tumore im ZNS und in den dorsalen Wurzelganglien. Reisoliertes Virus aus den Lebern der Puten verursachte in damit infizierten Hühnerküken 3 Wochen p.i. neurale, viszerale und okuläre MK-Läsionen.

WITTER et al. (1970) infizierten Beltsville Puten als Eintagsküken intraabdominal mit in Zellkultur vermehrten MKV-Stamm JM und FC 127. Während bei keinem der fünf mit FC 127 infizierten Tiere nach Ende der 8. Lebenswoche pathologisch-anatomische Veränderungen gefunden werden konnten, fanden sich bei drei von sieben mit JM infizierten Puten Lymphome in der Leber. Zwei dieser Tiere starben innerhalb des

Versuchszeitraums in der 6. bzw. 7. Lebenswoche. Das histologische Bild der Lebertumore zeigte ein pleomorphes, mononukleäres Zellbild. Es fanden sich keine Nervenläsionen. In Kontakt gehaltene nichtinfizierte Putenküken zeigten keinerlei Erkrankungserscheinungen. Weder bei den FC 127 noch bei den JM infizierten Puten konnten mittels Agargelpräzipitationstest (AGPT) Antikörper nachgewiesen werden. Auch die Virusrückisolierung durch Inokulation von Blutzellen auf Hühner-Nierenzell-Kulturen bzw. durch die Herstellung von Zellkulturen aus den Nieren der infizierten Puten gelang nicht.

1974 veröffentlichten WITTER et al. eine größere Studie zur Empfänglichkeit von Puten des Typs „Arnett Large White“ hinsichtlich experimenteller Infektion mit den MKV-Stämmen JM, GA, RPL 39 und TK 809.

Der Stamm TK 809 wurde aus Puten isoliert, die im Labor ausgebrütet und dann in Gruppen von jeweils 22 Küken in Isolatoren bis zur 10. Lebenswoche gehalten wurden. Die Bruteier stammten von einem kommerziellen Putenzuchtbetrieb, der positiv hinsichtlich PHV war. Um eine vertikale Übertragung von PHV zu testen, wurden am Versuchsende Buffy-Coat-Zellen dieser Puten auf Enten-Emryo-Fibroblasten (EEF) inokuliert. Bei zwei von fünf Buffy-Coat-Pools aus einem Isolator wurde TK 809 isoliert, eines der untersuchten Seren aus diesem Isolator hatte im indirekten IFT nachweisbare Antikörper gegen MKV. TK 809 verursacht in Hühnerküken typische MK-Läsionen. Wie sich die in den Isolatoren befindlichen Puten mit MKV infizieren konnten oder ob eventuell eine vertikale Infektion – wie sie für MKV untypisch wäre – vorlag war nicht klärbar.

Am Ende der zehnwöchigen Versuchszeit hatten 33 der 192 mit JM, GA, RPL 39 bzw. TK 809 infizierten Puten (17,2%) pathologisch-anatomische oder -histologische Läsionen, von denen 29 (15,2%) als histologisch hauptsächlich lymphoproliferativ beschrieben wurden. Im Einzelnen zeigten bei einer Infektion mit JM 15,2%, mit GA 5,6%, mit RPL 39 20,8% und mit TK 809 22,1% der Versuchstiere Läsionen.

27 der erkrankten Puten starben zwischen der 3. bis 10. Lebenswoche. Pathologisch-anatomische Veränderungen traten bei 26 Tieren auf, es handelte sich überwiegend um vergrößerte Lebern und Milzen mit weißen Läsionen im Parenchym. Seltener waren Nieren, Ovarien und Lungen betroffen. In einem Fall waren Nerven vergrößert.

Virusreisolierung gelang bei 16 der 166 Versuchstiere (9,7%) durch Inokulation von Buffy-Coat-Zellen auf EEF. Bei 2-3% (JM und GA), 9% (RPL 39) und 27% (TK 809) der untersuchten Seren konnten mit dem indirekten Immunfluoreszenztest Antikörper gegen MKV nachgewiesen werden. Zwei von drei der nichtinfizierten Kontakttiere der TK 809-Gruppe erkrankten an MK, die Kontakttiere der anderen Gruppen erkrankten nicht.

PAUL et al. (1977b) infizierten 40 PHV-freie Puteneintagsküken der Linien Nicholas White und Jersey Buff mit dem MKV-Stamm GA intraperitoneal. Innerhalb der 29wöchigen Versuchsdauer starben 70% der Versuchstiere. Die Mortalität hatte eine deutliche Spitze in der 9. und 10. Lebenswoche. 77% der Puten hatten MK-typische Läsionen v.a. in Leber und Milz, aber auch Herz, Gonaden, Lunge, Niere, Drüsenmagen und Bursa Fabricius waren betroffen. Die Organe waren diffus vergrößert oder zeigten 1-4 mm große Tumore, die Bursa Fabricius war atrophiert. Histologisch fanden sich Lymphozyten und Lymphoblasten, pyknotische Zellkerne und mitotische Figuren. Virus konnte bei 4 von 12 Tieren in der 8. Lebenswoche in aus den Nierenzellen der getöteten Tiere gewonnenen Kulturen reisoliert werden. Bei keiner der 20 ebenfalls in der 8. Lebenswoche entnommenen Serumproben konnten mit dem AGPT Antikörper gegen MKV nachgewiesen werden.

ELMUBARAK et al. (1981) infizierten Nicholas Puteneintagsküken intraperitoneal mit MKV-Stamm GA und untersuchten in der 8 Wochen dauernden Versuchsphase wöchentlich 3-4 der Versuchstiere hinsichtlich Virämieverlauf und Entwicklung der pathologisch-anatomischen und -histologischen Veränderungen. Zur Untersuchung des Virämieverlaufs wurden Buffy-Coat-Zellen der getöteten Tiere auf EEF verbracht. Sie fanden, daß die Puten ab der 1. Lebenswoche eine persistierende Virämie entwickelten. Im Vergleich mit ebenso infizierten Hühnern waren die Titer der nachweisbaren zirkulierenden MKV bei den Puten deutlich niedriger. Erste histologische Veränderungen wurden in der 2. Lebenswoche, erste pathologisch-anatomische Läsionen in der 5. Lebenswoche beobachtet.

Von 87 Puten zeigten 58% makroskopisch erkennbare Veränderungen, bei 85% wurden histologische Läsionen entdeckt. Betroffen waren dabei v.a. Leber, Milz, Niere,

Gonaden, Herz, Haut und auch Nerven. Letztere waren bei 30% der Puten histologisch und bei ca. 7% in Form von Verdickung und Verlust der Querstreifung verändert. Die pathologisch-anatomischen Läsionen der Organe zeigten sich in Parenchymvergrößerung und multiplen weißen Herden. Histologisch waren in erster Linie Lymphozyten, Lymphoblasten und Retikulumzellen nachweisbar.

Um einen Hinweis auf eine eventuelle frühe lytische Infektion zu erhalten, wurden desweiteren sechs 21 Tage alte Putenküken intraabdominal infiziert und 7 bzw. 9 Tage p.i. auf das Vorliegen von Retikulumzellhyperplasien und Lymphozytenentleerung in Bursa Fabricii, Thymus und Milz untersucht. Die Autoren beschrieben diese Veränderungen bezüglich Thymus und Milz als mild, in der Bursa Fabricii konnten keine Läsionen nachgewiesen werden.

In den Versuchen lag die Mortalität bei 59,5%, die durchschnittliche Zahl der Tage vom Zeitpunkt der Infektion bis zum Tod eines Tieres (Median days to death) betrug 38 Tage.

ELMUBARAK et al. beschrieben 1982 ihre Ergebnisse hinsichtlich des Versuchs Puten durch Vakzination mit dem PHV-Stamm FC 126 bzw. attenuiertem MKV-Stamm JM (JMatt.) gegen eine Challengeinfektion mit dem MKV-Stamm GA zu schützen. Es wurden verschiedene Termine für Vakzination und Challenge getestet. Nach Impfung mit FC 126 am ersten Lebenstag und Belastungsinfektion am 10. Lebenstag erkrankten 47% der Tiere (n = 17), während 42% der nicht geimpften Kontrollgruppe (n = 26) betroffen waren. In einem weiteren Versuch wurden 23 Putenküken am 1. Lebenstag und 32 Putenküken am 19. Lebenstag mit PHV FC 126 geimpft, die Challengeinfektion wurde am 26. Lebenstag durchgeführt. 17% der am 1. Lebenstag und 21% der am 19. Lebenstag geimpften Puten erkrankten an der MK. Im Vergleich dazu erkrankten 29% der ungeimpften Kontrolltiere (n = 34). Auch der Einsatz von JMatt. am ersten Lebenstag mit einer Belastungsinfektion am 10. Lebenstag erbrachte keine signifikante Schutzwirkung.

Auch NAZERIAN und SHARMA (1984) konnten keine protektive Wirkung von an Nicholas Eintagsputenküken verabreichtes PHV FC 126 gegen eine Belastungsinfektion mit MKV-Stamm GA feststellen. In einem anderen Experiment konnten sie deutliche

Unterschiede in der Empfänglichkeit der Nicholas Hybrid-Puten im Vergleich zu der Linie „Beltsville“ feststellen, letztere zeigten nach Inokulation des MKV-GA keine Anzeichen einer MK.

Eine vor der experimentellen MKV Infektion durchgeführte Bursektomie führte sowohl bei Nicholas, als auch bei Beltsville Puten zu einer signifikanten Steigerung der MK-Rate von 10% auf 65% bzw. 0% auf 45%.

POWELL et al. (1984) infizierten 60 Putenküken zweier nicht näher bezeichneter Putenlinien intraperitoneal mit GA, JM und HPRS-16. Sie konnten jedoch nur nach der Infektion mit GA Lymphombildung in Leber und Milz und Verluste beobachten.

In einem weiteren Experiment sollte mehr Erfahrung zur Pathogenese der MK bei Puten gesammelt werden. Zu diesem Zweck wurden aus einer am 10. Lebenstag mit GA infizierten Gruppe von Putenküken ein- oder zweimal wöchentlich 5 Tiere histologisch und virologisch untersucht. Erst 31 Tage p.i. konnten histologische Veränderungen in verschiedenen Organen nachgewiesen werden. Aus 5 von 200 virologisch untersuchten Proben (Suspensionen aus Thymus-, Bursa Fabricii-, Milzgewebe und Buffy-Coat-Zellen) konnte in HN2 Virus reisoliert werden. Es wurden keine Veränderungen bei den Puten nach Infektion mit GA gefunden, die denen der frühen lytischen Infektion des lymphatischen Gewebes des Huhnes entsprächen. Diese Unterschiede zu der Studie von ELMUBARAK et al. (1981) könnte nach Ansicht der Autoren an der Verwendung unterschiedlicher Putenlinien liegen. Desweiteren konnten keine Hinweise auf das Vorliegen einer produktiven Infektion des Federfollikelepithels gefunden werden.

NAZERIAN et al. (1982) etablierten vier lymphoblastoide Zelllinien aus Tumoren von mit GA infizierten Nicholas-Puten. Sie wiesen einen B-Lymphozyten-Ursprung und die Bildung von Immunglobulinen nach. Dagegen sind in den von POWELL et al. (1984) etablierten 12 Zelllinien hauptsächlich T-Lymphozyten-Antigene nachgewiesen worden. Nach Meinung der Autoren könnte die Verwendung von Anti-Hühner-Immunsereen bei der ersten Studie falsche Ergebnisse erbracht haben.

COUDERT et al. (1995) infizierten Puteneintagsküken mit den MKV Stämmen RB-1B und HPRS 16. 5 von 8 mit dem sehr hoch onkogenen Stamm RB-1B infizierten Puten erkrankten ab der 20. Lebenswoche an der klassischen MK, während keines der 11 mit dem hoch onkogenen Stamm HPRS 16 infizierten Tiere pathologische Läsionen aufwies.

### **2.5.2 Feldinfektionen mit MKV bei Puten**

Seit 1990 wurden in Frankreich Fälle von MK bei Puten aufgrund von Feldinfektionen beobachtet. Die betroffenen Putenfarmen lagen in einem Gebiet mit Broilerbetrieben, in denen zuvor eine deutliche Zunahme der MK beobachtet wurde. Sehr hohe Mortalitätsraten von 80 - 100% wurden beobachtet. Die Mortalität begann in der 12. Lebenswoche und ging bis zur 30. Lebenswoche. Zuerst schienen nur Bronzeputen empfänglich zu sein, später zeigte sich das Krankheitsbild aber auch bei BUT-Hybridputen. Klinisch zeigten die erkrankten Tiere Apathie, Abmagerung, Dehydratation, z.T. Durchfall, Festliegen und gelegentlich Paralysen. Pathologisch-anatomisch wurden Veränderungen v.a. in Milz, Leber, Nieren, Herz, Drüsenmagen und Haut nachgewiesen. Die vergrößerten Organe zeigten diffuse Infiltrationen oder knotige Zubildungen. Histologisch fand sich das für die MK bei Hühnern typische und auch nach experimenteller Infektion von Puten mit MKV vorgefundene pleomorphe Zellbild mit überwiegend lymphatischen Zellen. Die Bestätigung für das Vorliegen einer MKV-Infektion erfolgte, indem mit dem Blut erkrankter Puten SPF-Hühnereintagsküken infiziert wurden und in deren Blut MKV mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden konnte.

Zur Eindämmung der MK-Ausbrüche wurden von 1991 bis 1994 in den Bezirken Landes und Gers ca. 80.000 Puteneintagsküken mit dem Impfstamm Rispens (CVI 988) geimpft. Lediglich in 2 Mastgruppen kam es nach der Impfung noch zu Verlusten durch die MK, die Mortalität lag aber nur noch bei 10% (COUDERT et al., 1995).

Seit 1992 wurden in Israel vermehrt tumoröse Veränderungen bei Puten hinsichtlich ihrer Ätiologie untersucht. In den betroffenen Herden wurde ein breites Spektrum klinischer Symptome beobachtet, u.a. Lahmheit, Durchfall und Abmagerung. Das Alter der erkrankten Tiere lag meist zwischen der 8. und 21. Lebenswoche, die Mortalitätsrate erreichte 10-42%.

Makroskopisch waren Läsionen v.a. in Leber, Milz, Niere, Lunge und Herz zu erkennen, gelegentlich fanden sich auch Verdickungen der N. ischiadici, die histologischen Untersuchungen zeigten ein pleomorphes, lymphoides Zellbild.

Von 36 untersuchten Herden waren in der PCR 17 MKV-positiv, in 3 Herden konnte neben MKV-DNA auch REV-DNA nachgewiesen werden und in jeweils einer Herde fanden sich eine Mischinfektion mit MKV und LPDV bzw. MKV, REV und LPDV (DAVIDSON et al., 1996; MALKINSON et al., 1996).

DAVIDSON et al. (2002b) verglichen das Glykoprotein B-Gen und Antigen eines ihrer Puten-MKV-Isolate (MKV-Stamm La) mit dem gB-Gen und Antigen der MKV-Stämme MD11 und RB1B. Die Sequenzierung des Gens zeigte keinerlei Unterschiede bei den drei Viren, die Untersuchung der Anigen-Epitope zeigte dagegen einen Unterschied zwischen Hühner-MKV und Puten-MKV. Die Forscher spekulieren über eine möglicherweise nach der Virustranskription und Translation auftretende Veränderung, weitere Untersuchungen dieses Phänomens erscheinen nötig.

ROSATI et al. (1999) untersuchten mit der PCR tumorös veränderte Lebern und teilweise auch die Milzen von 22 Puten auf das Vorliegen von REV- bzw. MKV-DNA. Die Puten stammten aus 8 verschiedenen Herden und waren der regulären Schlachtung im Schlachthaus zugeführt worden. In 19 Proben wurde REV-DNA nachgewiesen und in drei Proben konnte MKV-DNA nachgewiesen werden. Somit ist auch in Italien das Auftreten von Infektionen mit virulenten MKV bei Puten nachgewiesen.

PENNYCOTT und VENUGOPAL (2002) beschreiben das Auftreten eines MKV-Ausbruchs in einer Putenherde in Schottland. Die 960 Puten wurden auf einem Versuchsgut im Stall in Bodenhaltung gehalten. Auf dem Betrieb wurden weitere Putenherden und Hühner gehalten. Alle ab der 8. Lebenswoche gestorbenen oder getöteten Puten wurden einer pathologisch-anatomischen Untersuchung unterzogen. Bis

zur 17. Lebenswoche gab es keinerlei Hinweise auf das Vorliegen einer neoplastischen Erkrankung. Zwischen der 17. und 21. Lebenswoche starben 18 Puten, bei denen sich makroskopisch erkennbare Tumore in Lebern (18/18), Milzen (16/18), Lungen (15/18), Herzen (13/18) und Nieren (7/18) fanden. Weiterhin fanden sich Veränderungen der Drüsenmagen (6/18), Dünndärme (6/18), Pankreas (3/18), Bursa Fabricii (1/18), Muskelmagen (1/18) und Haut (1/18). An den Nerven konnten keinerlei makroskopische Läsionen entdeckt werden. Die histologische Untersuchung von Organen mit makroskopischen Veränderungen zeigte starke Infiltrationen mit Lymphoblasten, kleinen und großen Lymphozyten, Makrophagen und Retikulumzellen. In makroskopisch unauffälligen Organen konnten teilweise mildere Infiltrationen des gleichen Zelltyps gefunden werden. Bei 6 der erkrankten Puten wurden in den N. ischiadici Infiltrationen mit pleomorphen mononukleären Zellen gesehen.

Von drei der erkrankten Puten wurde Leber- und Milzgewebe mittels PCR auf das Vorliegen einer Infektion mit REV, LPDV, ALV (alle Subtypen) und MKV durchgeführt. Die Untersuchung erbrachte ein negatives Ergebnis bezüglich des Vorliegens einer Infektion mit REV, LPDV und ALV wogegen 5 der 6 untersuchten Proben ein positives Ergebnis bezüglich des Vorliegens einer Infektion mit MKV erbrachten.

### **2.5.3 Experimentelle Infektionen von Puten und Hühnern mit aus natürlich infizierten Puten isolierten MKV**

COUDERT et al. (1995) injizierten Blut erkrankter Puten intraperitoneal in 14 SPF Hühnereintagsküken. Alle Versuchstiere starben zwischen der 5. und 10. Lebenswoche. Im Blut dieser Tiere wurde unter Anwendung monoklonaler Antikörper das Vorliegen einer Infektion mit pathogenem MKV nachgewiesen. Desweiteren wurden gesunde, 1-3 Tage alte Puten mit dem Blut kranker Puten intraperitoneal infiziert und erkrankten ab dem 36. Lebenstag an der MK. In einem weiteren Versuch wurden in Kontakt zu kranken Puten SPF-Hühnereintagsküken und gesunde, 14 Tage alte Putenküken eingestallt. Die Versuchstiere erkrankten teilweise an der MK, wobei die Hühner sich als deutlich empfänglicher erwiesen. So entwickelten 5 von 10 SPF-Hühnerküken ab der 10. Lebenswoche histologische Veränderungen, während nur 2 von 25 Putenküken in der 12. bzw. 16. Lebenswoche erkrankten.

DAVIDSON et al. (2002a) infizierten 10 2 Tage alte Putenküken (BUT) und 10 3 Tage alte Hühnerküken intraperitoneal mit einer Suspension aus einer tumorös veränderten Milz. Die Milz stammte aus einer an MK erkrankten Mastpute, und der MKV-Stamm wurde als MKV-Stamm Ar bezeichnet. Die infizierten Tiere, und jeweils 10 nicht infizierte Puten bzw. Hühner, wurden für die Versuchsdauer in getrennten Isolatoren gehalten. Nach 33 Tagen wurde der Versuch beendet. In dieser Zeit starb keines der infizierten Hühner, aber 6 der 10 infizierten Putenküken. Bei den infizierten Hühnerküken wurden bei drei oder vier Tieren zelluläre Infiltrationen in Leber bzw. Nerven gefunden, ein oder zwei Tiere zeigten histologische Veränderungen in der Bursa Fabricii und dem Thymus. Mit der PCR konnte in 7 von 30 während des Versuchs genommenen Blutproben und in 12 von 30 untersuchten Organproben der Hühner (Leber, Milz, Nieren) MKV nachgewiesen werden. Bei den infizierten Puten konnten nur bei zwei oder drei Tieren histologische Veränderungen in Milz und Bursa gefunden werden. Mit der PCR konnte bei keiner der während des Versuchs genommenen 21 Blutproben und nur in den Organen einer von den drei zum Versuchsende getöteten

Puten MKV nachgewiesen werden. Deshalb ist nach Meinung der Autoren von einer weiteren Erkrankung der Puten auszugehen.

In einem weiteren Versuch wurden 20 Puteneintagsküken (BUT) mit kommerzieller CVI 988-Vakzine geimpft. 20 ungeimpfte Putenküken dienten als Kontrolltiere. Im Alter von 8 Tagen wurden jeweils 10 geimpfte und 10 ungeimpfte Putenküken mit einer Leukozytensuspension infiziert. Die Leukozyten stammten von 2 Puten, welche aus einem Betrieb mit starker MK Problematik kamen (MKV-Stamm La). Die 4 Gruppen à 10 Puten wurden 40 Tage in separaten Isolatoren, danach 40 Tage in Käfigen und anschließend bis zum Versuchsende in Bodenhaltung auf Einstreu gehalten. Es konnte kein protektiver Effekt durch die Impfung erzielt werden, 71% der nicht vakzinierten und 83% der vakzinierten Puten starben nach der Kontrollinfektion mit dem MKV-Stamm La. Makroskopisch und histologisch fanden sich bei diesen Puten Veränderungen wie sie für die MK typisch sind. Mit der PCR konnte bei 43 bzw. 50% der MKV-infizierten Puten MKV-DNA in Blut- oder Organproben nachgewiesen werden, bei allen nichtinfizierten Puten verliefen die PCR-Untersuchungen negativ. Während der Versuchszeit starben insgesamt drei Kontrolltiere, aufgrund des negativen PCR-Ergebnisses von Proben dieser Kontrolltiere wird von einer weiteren Erkrankung anderer Ätiologie ausgegangen (DAVIDSON et al., 2002a).

## **2.6 Fragestellungen der eigenen Untersuchungen**

Die ersten erkrankten Puten gelangten im Rahmen der Betreuung von Hausgeflügelbeständen durch den hier ansässigen Geflügelgesundheitsdienst (GGD) zur Untersuchung in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität, Gießen. Deshalb war es zunächst vordringlichstes Ziel, die Ätiologie der Erkrankung zu klären und darauf aufbauend geeignete Maßnahmen zur zukünftigen Verhütung weiterer Verluste zu empfehlen.

Weil nach dem ersten Bestand vier weitere Herden in anderen Betrieben mit einem ähnlichen Problem behaftet erschienen, sollten im Rahmen einer Dissertation möglichst viele Daten aus den Bereichen Anamnese, Symptomatologie sowie Epidemiologie

gesammelt und ausgewertet werden. Die speziellen Arbeiten an ausgewählten Tieren zur makroskopischen Pathologie (n = 78) und Histologie (n = 66), sowie die Untersuchungen zur Virusisolierung (n = 111) und zu den Antikörpernachweisen (n = 73) bilden einen zusätzlichen Teil zu den diagnostischen Untersuchungen. Erst der Einsatz der PCR (n = 36) erbrachte klare Ergebnisse hinsichtlich des ursächlich am Krankheitsgeschehen beteiligten Herpesvirus und zugleich den Ausschluß anderer, mit Tumorbildung einher gehender viraler Krankheiten.

Die Resultate aller Arbeiten, die im Zeitraum von Juli 1996 bis Oktober 2000 durchgeführt wurden, werden nachfolgend dargestellt und diskutiert.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Herkunft des Untersuchungsmaterials

Es wurden Organproben, Blutproben und Kloakentupfer von Puten (lebend, gestorben bzw. getötet) fünf verschiedener Halter untersucht. Die Betriebe liegen in Hessen, Nordrhein-Westfalen und Baden-Württemberg. Die klinischen, pathologisch-anatomischen und histologischen Untersuchungen erfolgten im Zeitraum von Juli 1996 bis Oktober 2000.

Die Zahlen der aus den fünf Betrieben untersuchten Puten bzw. eingesendeten Organproben ergeben sich aus folgender Übersicht:

<b>Betrieb</b>	<b>Zahl der Puten lebend/tot</b>	<b>Zahl der Puten Organproben</b>	<b>Altersspanne in Wochen</b>
A	60/9	1	2-29
B	3/0	0	17-20
C	0/0	1	?
D	0/0	1	20
E	1/5	0	12-21

##### **Betrieb A:**

Es handelt sich um einen hessischen Geflügelbetrieb, auf welchem außer Puten auch Hühner (legereife Junghennen und Broiler), Mastenten, Gänse (Eltern- und Masttiere) und Perlhühner gehalten werden. 1992 wurden erstmals ältere Puten eingestallt, seit 1993 wurden Puteneintagsküken (BUT Big 6) aufgezogen, welche ab der 6.

Lebenswoche weiter verkauft wurden. Die Tiere wurden in Bodenhaltung im Stall gehalten, ältere Tiere erhielten Zugang zu einer Weide.

1994 kam es bei einem von drei Durchgängen zu erhöhten Verlusten. Es starben ab der 7. Lebenswoche zwischen 10 und 50 % der bereits verkauften Puten. Der hinzugezogene Tierarzt diagnostizierte „Leukose“. Im Dezember 1994 wurde der Stall geräumt, gereinigt und desinfiziert.

Im März 1995 wurden erneut Puteneintagsküken eingestallt. Bei diesem ersten Durchgang im Jahre 1995 trat das schon bekannte Krankheitsbild bereits im Aufzuchtsbetrieb auf. Tiere ab der 5. Lebenswoche waren betroffen. Die Verluste bei den verkauften und an verschiedenen Standorten gehaltenen Tieren betragen zwischen 20-60%. Erneut wurde vom betreuenden Tierarzt die Diagnose „Leukose“ gestellt. Die verbliebenen lebenden Tiere wurden gekeult, der Stall gereinigt und desinfiziert. Im Mai 1995 wurden wieder Eintagsküken eingestallt. Diese wurden auf dem Betrieb aufgezogen und gemästet und zeigten bis zur Schlachtung (ab der 21. Lebenswoche) keinerlei Krankheitsanzeichen. Am Ende des Jahres wurde der leere Stall wieder gereinigt und desinfiziert.

1996 wurden von einer anderen Brüterei Puteneintagsküken (BUT Big 6) und Bronzeputeneintagsküken gekauft und auch der Futterlieferant gewechselt. Die Küken beider Herkünfte wurden im März und April eingestallt, erste Krankheitsfälle traten ab der 5. Lebenswoche auf. Der Verkauf der Tiere wurde daraufhin eingestellt. Bis September 1996 waren ca. 30% der eingestellten (etwa 1500) Puten gestorben, genaue Daten konnten wegen mangelnder Aufzeichnungen nicht erhoben werden.

Mitte Oktober 1996 wurde eine Gruppe 6 Wochen alter Puten eingestallt, diese blieben bis zum Schlachtermin Mitte Dezember 1996 unauffällig.

Ab Juli 1996 wurden gestorbene oder krank erscheinende Puten in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität, Gießen untersucht. Es wurden 30 Tierkörper, Organproben von 1 Schlachtpute, sowie im Bestand entnommene Kloakentupfer (n = 12) und Blutproben (n = 38) untersucht.

Da auf diesem Betrieb weiterhin Puten aufgezogen werden sollten, wurde versucht, ob eine Impfung gegen die Mareksche Krankheit eine Möglichkeit zur Verminderung der hohen Tierverluste darstellen könnte. Dazu wurden am 04.10.1996 in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische 52 Puteneintagsküken (BUT Big 6) eingestallt.

28 Küken wurden am Einstellungsdatum mit Nobilis® Rismavac (Intervet, Ch-B. 96D25A) geimpft. Pro Tier wurden 0,2 ml gebrauchsfertige Vakzine s.c. in den Nackenbereich appliziert. Zur Unterscheidung wurden die Puten mit Flügelmarken gekennzeichnet. Die ungeimpften Küken erhielten die Nummern KK 1-18/97, die geimpften Küken die Nummern KK 21-44/97 wobei die Nummern 28, 37 und 41 nicht vergeben wurden. Am 17.10.1996 wurden 21 geimpfte und 18 ungeimpfte Putenküken (n = 39) in den Betrieb A verbracht und dort durch Abtrennungen geschützt zwischen den älteren Puten eingestallt. Ab dem 05.11.1996 wurde in wöchentlichem Abstand jeweils bei der Hälfte der Tiere Blut entnommen und die Blutleukozyten auf HEF-Kulturen inokuliert. Die Seren wurden mittels Virusneutralisationstest (VNT) auf das Vorliegen neutralisierender Antikörper gegen PHV FC 126 getestet. Gestorbene Tiere wurden sezirt und Proben für weiterführende Untersuchungen entnommen. Am 24.01.1997 wurden die überlebenden Tiere geschlachtet, die entnommenen Organe hinsichtlich pathologischer Veränderungen überprüft, sowie Gewebe- und Blutproben für weiterführende Untersuchungen entnommen.

### **Betrieb B:**

Es handelte sich um eine Putenhaltung zum Nebenerwerb. Anderes Geflügel wurde nicht gehalten. 1997 wurden erstmals 20 Puten (weiße Masttiere unbekannter Herkunft) in der 4. Lebenswoche von einem Geflügelhändler gekauft. Die Tiere wurden im Stall mit einem Auslauf gehalten. Erste Krankheitssymptome traten bei einem Tier ab der 8. Lebenswoche auf, es starb 4 Wochen später. Nachdem weitere fünf Tiere eingegangen waren, wurde eine Pute mit deutlichen Krankheitssymptomen in der 17. Lebenswoche in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, JLU Gießen verbracht, getötet und sezirt (Tb-Nr. 2112/97). In der 20. Lebenswoche wurden auf dem Betrieb bei zwei geschlachteten Puten die Organe begutachtet und Gewebeproben entnommen (Tb-Nr. 2291/1/97 und 2297/2/97). Blutproben dieser und 7 lebender Tiere wurden untersucht.

**Betrieb C:**

1997 wurden 10 Puten (weiße Masttiere unbekannter Herkunft) in Freilandhaltung mit festem Stall gehalten. Über den möglichen Kontakt mit anderem Geflügel und das genaue Alter der Tiere bei Einstallung ist nichts bekannt. Ab der 10. Lebenswoche traten erste Krankheitssymptome auf. Ein Tier wurde im Veterinäruntersuchungsamt Kassel sezziert, Leber-, Milz-, Nierengewebe und eine EDTA-Blutprobe wurden zur weiteren Untersuchung in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische Institut für Geflügelkrankheiten, JLU Gießen geschickt (Tb-Nr. 2277/97).

**Betrieb D:**

Milz- und Leber einer 20 Wochen alten, erkrankten Pute wurden im Juli 1998 vom Geflügelgesundheitsdienst (GGD) Stuttgart in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, JLU Gießen gesendet (Tb-Nr. 608/98). Laut Vorbericht handelt es sich um einen Geflügelbetrieb, auf welchem außer Puten auch Legehennen, Broiler und Enten gehalten wurden. Es wurden ca. 150 Puteneintagsküken (BUT Big 6) in einem Stall aufgezogen. Über den Krankheitsverlauf ist nichts bekannt, da der Betriebsinhaber keine Aufzeichnungen führte und sich erst spät an den GGD Stuttgart wendete.

**Betrieb E:**

Auf dem Betrieb E wurden für einen Fütterungs- und Haltungsveruch 208 männliche Puteneintagsküken der Hybridlinie BUT Big 6 eingestallt. Diese wurden in den ersten 8 Lebenswochen (Aufzuchtphase) im Stall gehalten. Mit der in der 9. Lebenswoche beginnenden Mastperiode wurden 139 Puten weiterhin nur im Stall gehalten, während 69 Puten Zugang zur Weide erhielten. Ab der 12. Lebenswoche traten erste Tierverluste auf, ab der 14. Lebenswoche stiegen die Verlustzahlen deutlich an. Die Gesamtverluste betrugen bis zum Ende der Mastperiode in der 21. Lebenswoche 58,2%. Aus diesem Betrieb wurde im Juni 2000 eine 12 Wochen alte, verendete Pute im Institut für Geflügelkrankheiten der JLU Gießen untersucht (Tb-Nr. 1278/00). Weitere 5 Puten und 16 Blutproben wurden bis August 2000 zur Untersuchung in die Klinik für Vögel,

Reptilien, Amphibien und Fische, JLU Gießen verbracht (Tb-Nr. 1307/00, 1409/00, 1473/1/00, 1473/2/00, 1899/00, K 807/1-15/00).

Außer Puten wurden – neben anderen Nutztierarten - auch Hühner auf diesem Betrieb gehalten. Diese waren nicht gegen Mareksche Krankheit geimpft und zeigten Krankheitssymptome und pathologische Veränderungen, wie sie für die Mareksche Krankheit beim Huhn typisch sind.

**Tabelle 2:    Untersuchte Puten und untersuchte Organ-, Blut- und Tupferproben von Puten**

<b>B<sup>1</sup></b>	<b>Nr.<sup>2</sup></b>	<b>M.<sup>3</sup></b>	<b>Alter in Wochen</b>	<b>Viro. US<sup>4</sup></b>	<b>Sero. US<sup>5</sup></b>	<b>Histo. US<sup>6</sup></b>	<b>PCR</b>
A	<b>2361- 2364/96</b>	10/3 Puten	13	4x: Ni, Mi, Le, P, BF, Th, Da	n.d.	3x: Ni, Le, Mi 1x: Da, He 2x: N.isch, Pl.b	n.d.
A	<b>2503/96</b>	1/0 Pute	15	Ni, Le, Mi	n.d.	Le, Mi, Hi, Ne	n.d.
A	<b>2713/96</b>	1/0 Pute	17	Le, BF, P, NN, Ni, Th,	MKV; REV; LLV	Le, Ni, Mi, Th, Sd	n.d.
A	<b>2714/96</b>	1/0 Pute	17	Le, BF, P, NN, Mi, Th	MKV; REV; LLV	Le, Ni, Mi, Th, Sd	n.d.
A	<b>3003/T/ 96</b>	12 Kloaken- tupfer	20	LL-P27-Antigen	n.d.	n.d.	n.d.
A	<b>3003/B/ 96</b>	7 Blut- proben	20	Leu	MKV; REV; LLV	n.d.	n.d.
A	<b>3004/1-5 und 7- 9/96</b>	8 Blut- proben	20	n.d.	MKV; REV; LLV	n.d.	n.d.

Fortsetzung Tabelle 2

<b>B<sup>1</sup></b>	<b>Nr.<sup>2</sup></b>	<b>M.<sup>3</sup></b>	<b>Alter in Wochen</b>	<b>Viro. US<sup>4</sup></b>	<b>Sero. US<sup>5</sup></b>	<b>Histo. US<sup>6</sup></b>	<b>PCR</b>
A	3006/96	1/0 Pute	20	Le, Mi, Ni, BF, Th, Sd, Ov, Hi, Mm, Lu, Tr, NN	n.d.	Le, Mi, P, Ne	n.d.
A	3274/96 bis 3278/96	5/0 Puten	22	4x: Le, Mi, Th, BF, Sd, He, NN, Pl.b, N.isch, Hi, Ct, Go, Fe, Tadr, Leu	2x: MKV; REV; LLV; 4x PHV	4x: Le, P.b, Le 3x: Mi 2x N.isch 1x: He, DM	n.d.
A	L5-L28	23 Blut- proben	24	Leu	n.d.	n.d.	n.d.
A	3392/96	0/1 Pute	24	Le, Mi, BF, Sd, N.isch, P.b, Fe, Ct, Subkutistumor	n.d.	P.b, N.isch, Sd, BF, Mi, Le, Ni	n.d.
A	3393/96	1/0 Pute	24	Le, Mi, BF, Sd, N.isch, P.b, Fe, Ct, Th, NN, Ho, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	P.b, N.isch, Le, BF, Mi, Ni, Da	n.d.
A	3394/96	1/0 Pute	24	Le, Mi, BF, Sd, N.isch, P.b, Fe, Ct, Th, NN, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	P.b, N.isch, Le, DM, Ni, BF, Mi	n.d.
A	3395/96	1/0 Pute	24	Le, Mi, BF, Sd, N.isch, P.b, Fe, Ct, Th, NN, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	P.b, N.isch, Ni, Le, BF	n.d.

Fortsetzung Tabelle 2

<b>B<sup>1</sup></b>	<b>Nr.<sup>2</sup></b>	<b>M.<sup>3</sup></b>	<b>Alter in Wochen</b>	<b>Viro. US<sup>4</sup></b>	<b>Sero. US<sup>5</sup></b>	<b>Histo. US<sup>6</sup></b>	<b>PCR</b>
<b>A</b>	<b>3658/96</b>	1/0 Pute	28	Ni, N.isch, P.b, Le, He, Mi, Th, Sd, Fe, BF, NN, Ct, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	P.b, N.isch, Ni, Le	n.d.
<b>A</b>	<b>3659/96</b>	1/0 Pute	28	Ni, N.isch, P.b, Le, He, Mi, Th, Sd, Fe, BF, NN, Ct, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	P.b, N.isch., Le, Ni	n.d.
<b>A</b>	<b>3660/96</b>	1/0 Pute	28	Ni, N.isch, P.b, Le, He, Mi, Th, Sd, Fe, BF, NN, Ct, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	P.b, N.isch, Ni, Le, Mi, He, Sd	n.d.
<b>A</b>	<b>3758/96</b>	1/0 Pute	29	Ni, N.isch, P.b, Le, He, Mi, Th, Fe, BF, NN, Ct, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	Le, Ni	n.d.
<b>A</b>	<b>196/97</b>	Mi, Le, Lu, He, Blut	?	n.d.	n.d.	n.d.	MKV REV LPDV
<b>A</b>	<b>KK 1-44/97</b>	36/5 Puten	2-15	37x Leu	37x PHV	siehe Anhang, Tabelle B	MKV REV LPDV
<b>B</b>	<b>2112/97</b>	1/0 Pute	17	Le, Ni, Lu, He, Mi	n.d.	Mi, Kn	n.d.

Fortsetzung Tabelle 2

<b>B<sup>1</sup></b>	<b>Nr.<sup>2</sup></b>	<b>M.<sup>3</sup></b>	<b>Alter in Wochen</b>	<b>Viro. US<sup>4</sup></b>	<b>Sero. US<sup>5</sup></b>	<b>Histo. US<sup>6</sup></b>	<b>PCR</b>
<b>B</b>	<b>2291/1/97 bis 2291/9/97</b>	2/0 Puten; 9x Blut	20	Le, Mi, P, Ni, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	N.isch, Hi, Ni, Le, Mi, Sd, Ge	MKV REV LPDV
<b>C</b>	<b>2277/97</b>	Le, Ni, Mi, Blut, N.isch.	?	Le, Ni, Mi, Leu	MKV; REV; LLV; PHV	Le, Ni, Mi, N.isch.	MKV REV LPDV
<b>D</b>	<b>608/98</b>	Le, Mi	20	n.d.	n.d.	n.d.	MKV REV LPDV
<b>E</b>	<b>1278/00</b>	0/1 Pute	12	n.d.	n.d.	Mi, Ni, Sd, Cä	MKV REV LPDV
<b>E</b>	<b>1307/00</b>	0/1 Pute	12	Le, Mi, Ni	n.d.	Ni, Mi	n.d.
<b>E</b>	<b>1409/00</b>	0/1 Pute	14	Le, Mi	n.d.	Le, Ni, Mi, Ne	MKV REV LPDV
<b>E</b>	<b>1473/00</b>	0/2 Puten	15	n.d.	n.d.	Le, Mi	MKV REV LPDV
<b>E</b>	<b>1899/00</b>	1/0 Pute	21	Le, Mi, Ni, Leu	MKV; REV; LLV	Le, Ni, Mi, DM, Sd, Ho, Haut	n.d.
<b>E</b>	<b>K 807/1- 15/00</b>	15x Blut	21	4 x Leu	MKV; REV; LLV	n.d.	n.d.

### Legende zu Tabelle 2:

<sup>1</sup> **Betriebsbezeichnung** (A bis E)

<sup>2</sup> **Tagebuchnummern** (vergebene Nummer/Jahr)

<sup>3</sup> **Art des Untersuchungsmaterials** (lebend/tot)

<sup>4</sup> **virologisch untersuchte Organproben** (Le = Leber, Ni = Niere, Mi = Milz, NN = Nebenniere, Th = Thymus, Sd = Schilddrüse, BF = Bursa Fabricii, He = Herz, Lu = Lunge, Tr = Trachea, P = Pankreas, Go = Gonaden, Ov = Ovar, Ho = Hoden, P.b = Plexus brachialis, N.isch = Nervus ischiadicus, Ge = Gehirn, DM = Drüsenmagen, Da = Darm, Ct = Zäkaltonsille, Cä = Zäkum, Fe = Federkiel, Tadr = Talgdrüse, Mm = Muskulatur, Leu = Leukozyten)

<sup>5</sup> **serologische Untersuchungen;** MKV (AGPT), REV (ELISA), LLV (ELISA), PHV (VNT oder AGPT), LLV-P27-Antigen (ELISA)

<sup>6</sup> **pathohistologische Untersuchungen** (Abkürzungen siehe bei <sup>4</sup>)

**n.d.** = nicht durchgeführt

? = unbekannt

### 3.1.2 Zellkulturmedien, Puffer und Reagenzien

#### Basal Medium Eagle (BME) mit Earle'schen Salzen

100,0 ml/l BME EARLE Instamed 9,34 g/l mit L-Glutamin

(Seromed, Biochrom, Berlin)

100,0 ml/l Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)

1,0 ml/l Gentamicin-Lösung

0,5 ml/l Moronal-Suspension

15,0 ml/l Hapes-Puffer

gelöst in A. dest., mit 1 N NaOH (Merck, Darmstadt) auf pH 7,5 eingestellt und bei 6 °C gelagert.

#### Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit Earle'schen Salzen

96 ml/l MEM 10x (Seromed, Biochrom, Berlin)

56 ml/l TPB

13 ml/l 7,5 %iges Natriumbikarbonat

11 ml/l L-Glutamin-Lösung

11 ml/l Gentamicin-Lösung

18 ml/l Amphotericin B

gelöst in A. dest. und bei 6 °C gelagert.

**Zweifach konzentriertes MEM (MEM 2x) mit Earle'schen Salzen für Agar Overlay Medium**

181 ml/l MEM 10x (Seromed, Biochrom, Berlin)

256 ml/l TPB

42 ml/l Fetales Kälberserum (FKS)

1 ml/l Gentamicin

17 ml/l Amphotericin B

gelöst in A. dest.. Das Medium wurde in 50 ml Portionen abgefüllt und bei 6 °C gelagert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden je 50 ml MEM 2x 3 ml 7,5%iges Natriumbikarbonat zugegeben.

**2%iger Agar für Agar Overlay Medium**

1 g Agar (Difco, Michigan, USA) wurde in 50 ml A. dest. gegeben, durch Autoklavieren geschmolzen und sterilisiert, danach bei Zimmertemperatur gelagert.

**Agar Overlay Medium**

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Agar Overlay Medium wurde der 2%ige Agar im Wasserbad bei 100 °C erhitzt und nach Verflüssigung auf 55-60 °C abgekühlt. Dem flüssigen Agar wurde dann zimmerwarmes gepuffertes MEM 2x im Verhältnis 1:1 zugegeben und das gebrauchsfertige Medium zügig verarbeitet.

**RPMI 1640-Medium**

mit L-Glutamin (Life Technologies, Paisley, Scotland)

**Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB)**

29,5 g TPB-Pulver (Difco, Michigan, USA)

in 1000 ml A. dest. gelöst und bei 6 °C gelagert.

**L-Glutamin-Lösung:**

29,25 g L-Glutamin reinst (Serva, Heidelberg)

in 1000 ml A. dest. gelöst und bei – 20 °C gelagert.

**Gentamicin-Lösung:**

1 g Gentamicinsulfat (663 U/mg) (Seromed, Biochrom, Berlin)

in 20 ml A. dest. gelöst und bei 6 °C gelagert.

**Moronal-Suspension**

(Heyden, München)

500.000 I.E. auf 40 ml H<sub>2</sub>O

**Amphotericin B**

(Seromed, Biochrom, Berlin)

250 µg/ml

**Hepes-Puffer (Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure)**

238,3 g Hepes (Serva, Heidelberg) in 1000 ml A. dest. gelöst, filtriert und bei 6 °C gelagert.

**Dulbecco's Phosphate Buffer (DPB)**

8,00 g/l NaCl (Merck, Darmstadt)

0,40 g/l KCl (Merck, Darmstadt)

1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

0,20 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt)

gelöst in A. dest.. Der Puffer wurde steril filtriert, portioniert und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

**Trypsin-Stammlösung**

4,0 g/l Trypsin (1:250) (Difco, Michigan, USA)

10,0 g/l D(+)-Glucose-Monohydrat

gelöst in zehnfach konzentriertem DPB. Die Lösung wurde steril filtriert, portioniert und bei - 20°C gelagert. Für die Gebrauchslösung wurde die Stammlösung 1:10 mit A. dest. verdünnt.

### **Trypsin-Versen (TV)**

3,5 g/l	Trypsin (1:250)	(Difco, Michigan, USA)
0,2 g/l	EDTA-Na <sub>2</sub>	(Serva, Heidelberg)
1,0 g/l	D(+)-Glucose-Monohydrat	
0,5 ml/l	Phenolrotlösung (1g/l)	(Merck, Darmstadt)

gelöst in DPB. Die Lösung wurde mit 1 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt, steril filtriert, portioniert und bei - 20°C gelagert.

### **Phosphate buffered saline (PBS)**

8,09 g/l	NaCl
0,2 g/l	KCl
1,12 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
0,1 g/l	CaCl <sub>2</sub>
0,1 g/l	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O

gelöst in A. dest.. Der Puffer wurde mit 5 N HCl auf pH 7,0 eingestellt und bei 6 °C gelagert.

### **SPGA-EDTA-Puffer**

74,62 g/l	Saccharose
0,52 g/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1,25 g/l	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,83 g/l	L-Glutamin
10,00 g/l	Bovines Serum Albumin, Fraktion 5
2,00 g/l	EDTA-Na <sub>2</sub>

gelöst in A. dest.. Der Puffer (pH 6,5) wurde steril filtriert und bei - 20°C gelagert.

**5-Jodo-2-Desoxy-Uridin (IUDR), 10x** (Sigma, St. Louis, USA)  
50 µg in 1ml BME gelöst.

**Heparin-Natriumsalz** (Roth, Karlsruhe)  
150000 U/g

**Ficoll Separating Solution** (Seromed, Biochrom, Berlin)  
Isotone Lösung, Dichte: 1,077

**Formalin** (Merck, Darmstadt)  
min. 37%  
Zur Herstellung der Gebrauchslösung mit A. dest. auf 8% verdünnt.

**Paraplast Plus** (Sherwood Medical, St. Louis, USA)

**Isopropanol** (Merck, Darmstadt)

**Roti<sup>®</sup>-Histol** (Roth, Karlsruhe)

**Aceton** (Merck, Darmstadt)

**Serum-Glycerin** (Chroma Gesellschaft, Münster)

**Corbit-Balsam** (I. Hecht, Kiel-Hassee)

**HE-Färbelösungen:**

**Hämalaun-Stammlösung**

Lösung A:        1 g        Haematoxylin (Merck, Darmstadt)  
                         400 ml        A. dest.

Lösung B:        50,0 g        Kalialaun        (Riedel-de Haen, Seelze)  
                         0,2 g        Natriumjodat (Riedel-de Haen, Seelze)  
                         600 ml        A. dest.

Beide Lösungen wurden nach ihrer Anfertigung zusammengeführt und in braunen Glasflaschen bei Zimmertemperatur gelagert.

### **Choralhydratlösung**

50 g	Choralhydrat	(Riedel-de Haen, Seelze)
1 g	Zitronensäure	(Riedel-de Haen, Seelze)
100 ml	A. dest.	

### **Haemalaun-Gebrauchslösung**

200 ml	Haemalaun-Stammlösung
10 ml	Choralhydratlösung

Die angesetzte Färbelösung wurde gut durchmischt und vor Gebrauch 24 Stunden stehen gelassen.

### **1%ige Eosin-Stammlösung**

1 g Eosin (Merck, Darmstadt) wurde in 100 ml A. dest. gelöst.

### **Eosin-Gebrauchslösung**

80 ml	Eosin-Stammlösung
160 ml	A. dest.

### **Verdauungspuffer**

2,5 ml	NaCl-Lösung (14,61 g NaCl/ 50 ml A. dest.)
1,0 ml	Tris-HCl-Lösung (6,06 g Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan/ 50 ml A. dest.)
2,5 ml	EDTA-Lösung (9,3 g EDTA-Na <sub>2</sub> / 50 ml A. dest.)
2,5 ml	Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung (10,0 g SDS (Roth, Karlsruhe)/ 40 ml A. dest.)
184,0 ml	A. dest.

**Proteinase K-Lösung**

(Boehringer Mannheim, Mannheim)

14,4 mg/ml in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5

**Phenol**

(Roth, Karlsruhe)

Roti<sup>®</sup>-Phenol, redestilliertes, in TE-Puffer äquilibriertes Phenol**Phenol/Chloroform**

(Roth, Karlsruhe)

Roti<sup>®</sup>-Phenol/Chloroform, redestilliertes Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1, gesättigt mit TE-Puffer.**Natriumazetat-Lösung**

3 M Natriumacetat-trihydrat

(Merk, Darmstadt)

pH 5,4 in A. dest., autoklaviert und bei 6 °C gelagert.

**Ethanol**

(Roth, Karlsruhe)

**TE-Puffer**

0,97 g/l Tris-HCl, pH 7,4

0,37 g/l EDTA-Na<sub>2</sub>

gelöst in A. dest., portioniert und bei 6 °C gelagert.

**MasterAmp<sup>TM</sup> Tfl DNA Polymerase**

(Biozym, Hess. Oldendorf)

1U/μl

**Tfl-Puffer (20x)**

(Biozym, Hess. Oldendorf)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 400 mM

Tris-HCl (pH 9,0) 1 M

**Taq DNA Polymerase**

(Biozym, Hess. Oldendorf)

5U/μl

**Taq-Puffer (10x)** (Biozym, Hess. Oldendorf)

Tris-HCl (pH 8,3) 100 mM

KCl 500 mM

**Magnesiumchloridlösung-Lösung** (Biozym, Hess. Oldendorf)

25 mM

**Nukleotidmischung (dNTP Solution)** (Biozym, Hess. Oldendorf)dATP 6,25 mM Lösung in H<sub>2</sub>OdCTP 6,25 mM Lösung in H<sub>2</sub>OdGTP 6,25 mM Lösung in H<sub>2</sub>OdTTP 6,25 mM Lösung in H<sub>2</sub>O**Oligonukleotidprimer der PCR**

Die Oligonukleotidprimer wurden von der Firma MWG-Biotech, Ebersberg bezogen.

**PCR-Primer für MKV (SILVA, 1992):**

„MKV-A“: 5' TGC GAT GAA AGT GCT ATG GAG G 3'

„MKV-B“: 5' GAG AAT CCC TAT GAG AAA GCG C 3'

**PCR-Primer für REV (DAVIDSON, 1995a):**

„REV-A“: 5' CAT ACT GGA GCC AAT GGT T 3'

„REV-B“: 5' AAT GTT GTA CCG AAG TAC T 3'

**PCR-Primer für LPDV (DAVIDSON, 1996):**

„LPDV-A“: 5' CTT GCT GTT TTA AGC CAC AT 3'

„LPDV-B“: 5' AGC TAT AGG CTC CGC GTC AA 3'

**TAE-Puffer**

4,80 g/l Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan

2,70 g/l Natriumacetat x 3 H<sub>2</sub>O

0,37 g/l                      EDTA-Na<sub>2</sub>

gelöst in A. dest. , mit konz. HCl auf pH 7,2 - 7,4 eingestellt und bei 4 °C gelagert.

**Agarose NEEO Ultra-Qualität**                      (Roth, Karlsruhe)

**Molekulargewichtsstandard**

100-bp-DNA-Marker              1 µg/µl                      (Gibco BRL, Gaithersburg, USA)

100-bp-DNA-Marker                      (Biozym, Hess. Oldendorf)

**DNA BlueRun™ (Auftragepuffer) (5x)**      (AGS, Heidelberg)

Tris-HCl, pH 7,0              25 mM

EDTA                      150 mM

Bromphenolblau              0,05%

Glycerol                      25 %

**Ethidiumbromidlösung**                      (Serva, Heidelberg)

Stammlösung 3 mg/ml

### 3.1.3 Kontroll-DNA für die PCR

**MKV-DNA**

- a) Puten-MKV-DNA (T-MKV-DNA) bereitgestellt von Dr. I. Davidson, Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan, Israel
- b) GA-DNA (EcoRI-F und -X Fragmente) bereitgestellt von Dr. R. L. Witter, Avian Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, USA
- c) DNA extrahiert aus einer von Dr. C. Grund, Ludwig-Maximilian-Universität, München bereitgestellten Milz eines experimentell mit dem onkogenen MKV-Stamm „Italia“ infizierten Huhnes.

**REV-DNA**

Aus einem Tumor isolierte REV-DNA bereitgestellt von Dr. R. L. Witter, Avian Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, USA.

**LPDV-DNA**

DNA extrahiert aus einer von Dr. I. Davidson, Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan, Israel, bereitgestellten Milz einer mit LPDV infizierten Pute.

**3.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Tischzentrifuge Hettich Mikro 12-24	(Hettich, Tuttlingen)
Zentrifuge Hettich Rotanta/T	(Hettich, Tuttlingen)
Präzisionswaage P160N	(Mettler, Gießen)
Magnetrührer	(Kretschmer, Gießen)
Einblockautomat: Histocenter	(Shandon, Frankfurt/Main)
Einbettautomat: Citadell 1000	(Shandon, Frankfurt/Main)
Einbettkassette und Metalldeckel	(Shandon, Frankfurt/Main)
Gefrierschnittautomat: Frigocut-E 2800	(Reichert-Jung, Leica GmbH, Bensheim)
Mikrotom: Autocut 2040	(Reichert-Jung, Cambridge Instruments, Nußloch)
Färbeautomat: Varistain 24-2	(Shandon, Frankfurt/Main)
Mikroskop: Modell 62057	(Carl Zeiss, Oberkochen)
Mikroskop: Diavert	(Leitz, Wetzlar)
Inkubator: Modell B 5060 EK-CO <sub>2</sub>	(Heraeus, Hanau)
Inkubator: Modell Cellstar QWJ300TVBA	(Nunc, Wiesbaden)
Mikrowellenherd M 702	(Philips, Schweden)
DU 640 Spectrophotometer	(Beckman, USA)

Thermocycler MJ Research DNA Engine™	(Biozym, Hess. Oldendorf)
Elektrophoresekammer	(Keutz, Reiskirchen)
Spannungsquelle	(Desaga, Heidelberg)
Bildanalysegerät	(Herolab, Wiesloch)
pH-Meter	(Knick, Berlin)
Monovette EDTA KE	(Sarstedt, Nümbrecht)
Zellkulturgefäße	(Greiner, Frickenhausen oder Falcon, Becton Dickinson, NJ, USA)
Reaktionsgefäße 1,5 ml und 2 ml	(Eppendorf, Hamburg)
PCR-Reaktionsgefäße	(Biozym, Hess. Oldendorf)

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkulturen

#### 3.2.1.1 Herstellung von Hühner-Embryo-Fibroblasten-Kulturen (HEF)

Zur Gewinnung der Fibroblasten wurden 10 bis 11 Tage alte Hühnerembryonen (VALO, Lohmann, Cuxhaven) verwendet. Nach steriler Entnahme aus der desinfizierten Eischale wurden Köpfe und innere Organe entfernt, die Embryonen zweimal in Dulbecco's Phosphate Buffer (DPB) geschwenkt und in einer neuen Petrischale mit einer Schere zu einem dünnen Brei zerkleinert. In einem Erlenmeyerkolben wurde das homogenisierte Gewebe zweimal mit DPB mittels Magnetrührer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von Trypsin-Gebrauchslösung. Der Überstand der ersten Trypsinierung wurde verworfen, die danach gewonnenen zellhaltigen Überstände wurden in Zentrifugengläser unter Zugabe von FKS (ca. 1ml FKS/ 30 ml Überstand) überführt. Diese Überstände wurden anschließend bei 3000 g für 10 Sekunden zentrifugiert, die gewonnenen Zellpellets in Zellkulturmedium resuspendiert, durch Gaze filtriert und auf die gewünschte Zelldichte in BME mit Zusatz von 5 % FKS verdünnt. Aus einem Embryo ließen sich ca. 80 - 100 ml Zellsuspension gewinnen. Es folgte die Aussaat in die erforderlichen Zellkulturflaschen

und -schälchen, in welchen nach ein bis zwei Tagen bei einer Temperatur von 37 °C ein einschichtiger Zellrasen ausgewachsen war. Als Erhaltungsmedium wurde ab dann BME mit einem Zusatz von 2% FKS verwendet.

### **3.2.1.2 Herstellung von HEF-Subkulturen**

Zur Herstellung von Subkulturen dienten die zu einem dichten Zellrasen ausgewachsenen primären HEF-Kulturen. Nach dem Abgießen des Zellkulturmediums, erfolgte das Waschen des Zellrasens mit Trypsin-Versen-Lösung. Anschließend wurde die Zellkultur mit einer dünnen Schicht Trypsin-Versen-Lösung bedeckt und das Kulturgefäß ca. 5 min bei 37 °C aufbewahrt. In dieser Zeit lösten sich die Zellen einzeln ab und konnten dann in BME mit 5% FKS resuspendiert werden. Die so gewonnenen Zellen konnten dann je nach Bedarf in die entsprechenden Zellkulturgefäße ausgesät werden.

### **3.2.1.3 Herstellung von Hühner-Embryo-Nierenzell-Kulturen (HENZ)**

Zur Gewinnung der HENZ wurden 20tägig bebrütete Hühnerembryonen (VALO, Lohmann, Cuxhaven) verwendet. Sofort nach der sterilen Entnahme der Embryonen aus der desinfizierten Eischale wurden die Köpfe abgetrennt, die Leibeshöhle eröffnet und die inneren Organe entfernt. Mit einer kleinen Schere wurden die Nieren vorsichtig herauspräpariert und in einer Petrischale von bindegewebigen Strukturen und Harnsäureablagerungen weitestgehend befreit. Die Nieren wurden mit einer Schere zu einem homogenen Brei zerkleinert, welcher in einem Erlenmeyerkolben unter Zugabe von DPB mittels Magnetrührer mehrfach gewaschen wurde, bis der verbleibende Überstand klar war. Danach folgte die erste Trypsinierung, deren Überstand verworfen wurde. Die Überstände der drei folgenden Trypsinierungsvorgänge wurden durch eine 4-lagige Gaze filtriert und in einem Erlenmeyerkolben gesammelt, in welchen vorher 10 ml kaltes FKS gegeben wurde. Während der einzelnen Trypsinierungsvorgänge wurde die Zellsuspension im Kühlschrank gelagert. Um die empfindlichen Nierenzellen zu schützen, wurde die Trypsingebrauchslösung 1 : 1 mit DPB verdünnt eingesetzt. Die zellhaltige Suspension wurde anschließend in Zentrifugengläser überführt und bei 3000 g 10 Sekunden zentrifugiert, das so gewonnene Zellpellet in MEM mit Earle-Salzen

unter Zugabe von 7% FKS resuspendiert, auf die gewünschte Zelldichte verdünnt und in die entsprechenden Kulturgefäße verteilt. Aus den beiden Nieren eines Embryos ließen sich ca. 20 ml Zellsuspension gewinnen. Nach einer Inkubation von zwei Tagen bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> waren die Zellen zu einem einschichtigen Zellrasen ausgewachsen und konnten beimpft werden.

#### **3.2.1.4 Herstellung von Pekingenten-Embryo-Fibroblasten-Kulturen (EEF)**

Zur Gewinnung der EEF wurden 14tägig bebrütete Entenembryonen (Fa. Stolle, Westerscheps) verwendet. Der technische Vorgang erfolgte analog zur Herstellung der HEF, als Anzuchtmedium diente MEM mit Earle Salzen unter Zugabe von 10% FKS. Aus einem Embryo konnten 100 – 120 ml Zellsuspension gewonnen werden, welche 24 – 48 Stunden nach der Aussaat in den erforderlichen Kulturgefäßen bei 37 °C zu einem einschichtigen Zellrasen ausgewachsen war.

#### **3.2.2 Gewinnung peripherer Leukozyten**

Aus der Flügelvene mit Zusatz von Heparin (6 U/ml) bzw. EDTA gewonnenes Blut (2-9 ml) wurde bei 1500 U/min zentrifugiert. Die Buffy coat-Schicht wurde vorsichtig mit möglichst wenigen Erythrozyten abpipettiert, auf 1 ml Ficoll Separating Solution gegeben und anschließend bei 2500 U/min 15 Minuten zentrifugiert. Die dadurch von den noch vorhandenen Erythrozyten getrennten Leukozyten wurden abpipettiert und in 5 ml DPB resuspendiert. Nach 5 minütigem Zentrifugieren bei 1000 U/min wurde der Überstand verworfen, das Leukozytenpellet mit DPB oder RPMI 1640 resuspendiert und auf HEF- und/oder auf HENZ-Kulturen verbracht. Nach 48 Stunden wurden die Leukozyten beim Mediumwechsel so weitestgehend wie möglich vom Zellrasen abgewaschen. Die Passagierung der Zellkulturen erfolgte dann ein oder zweimal im Abstand von acht bis zehn Tagen.

Ein Teil der Blutproben wurden bei der Blutentnahme 1:1 mit RPMI 1640, welchem pro 100 ml 5,6 mg Heparin zugegeben worden war, gemischt um somit eine längere

Überlebensdauer der Leukozyten zu erreichen. Das Blut-Medium-Gemisch wurde dann 1:1 mit kaltem DPB vermischt, bei 1000 U/min 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Sediment wurde wieder 1:1 mit DPB vermischt, erneut bei 1000 U/min zentrifugiert und der Leukozytensaum vorsichtig abpipettiert. Der weitere Vorgang entsprach dem bereits beschriebenen.

### **3.2.3 Aufarbeitung der Gewebeproben für die Virusisolation**

Die Gewebeproben wurden den Tierkörpern möglichst steril entnommen und in Petrischalen verbracht. In diesen wurde ein etwa haselnußgroßes Stück mit einer Schere zu einem homogenen Brei zerkleinert und in Zentrifugengläser mit 4 ml BME inklusive 0,001% Enrofloxacin (Baytril® BAYER AG, Leverkusen) überführt. Bei den zuerst untersuchten Proben erfolgte dann eine Ultraschallbehandlung (3 Pulse bei 60%) mit anschließender Zentrifugation bei 1000 g für 5 Minuten. 0,2 ml des Überstandes wurden dann auf HEF-Kulturen verimpft.

Im Hinblick auf die Isolierung zellgebundener Viren wurde die Aufarbeitung des Probenmaterials modifiziert und 0,2 ml gewebehaltige Suspension ohne weitere Behandlung auf HEF- und/oder HENZ-Kulturen verimpft. Ein Teil der Proben wurde nach der Entnahme ebenfalls mit der Schere zerkleinert, anschließend mehrmals mit PBS gewaschen und danach trypsiniert, um möglichst viele Einzelzellen zu erhalten. Den so aufgearbeiteten Proben wurde dann BME mit 0,001% Baytril® zugegeben und 0,2 ml zellhaltige Suspension auf HENZ-Kulturen verbracht.

Die Passagierung der Zellkulturen erfolgte dann ein oder zweimal im Abstand von acht bis zehn Tagen.

### **3.2.4 Passagierung der Zellkulturen**

Bei den bis November 1996 untersuchten Zellkulturen wurde die Zellkultur mittels Zellschaber geerntet und mit dem Überstand in ein Reagenzglas überführt. Nach einer Ultraschallbehandlung (3 Pulse bei 60%) erfolgte eine Zentrifugation bei 1000 g/Minute für 5 Minuten. Anschließend wurden 0,2 ml des Überstandes auf die frische Zellkultur verimpft.

Um die Möglichkeit der Isolierung zellgebundener Viren zu verbessern, wurde ab November 1996 die Passagierung der Zellkulturen wie folgt ausgeführt. Nach Entfernung des Überstandes wurden dem Zellrasen 3 Tropfen Trypsin-Versen-Lösung zugesetzt und dieser nach etwa einer Minute Einwirkzeit mit 1 ml BME möglichst schonend resuspendiert. 0,2 ml der so gewonnenen zellhaltigen Suspension wurden auf frische Zellkulturen verimpft.

### **3.2.5 Lagerung von Virusisolaten**

Zellkulturen mit zytopathischen Veränderungen wurden nach Auffangen des Überstandes in Zentrifugenröhrchen mit Trypsin-Versen benetzt und die sich ablösenden Zellen mit 0,5 ml frischem BME resuspendiert und zu dem Überstand gegeben. Anschließend wurde bei 2000 U/min 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit BME auf 1 ml Volumen gebracht. Unter Zugabe von SPGA-EDTA-Puffer im Verhältnis 1:1 wurde die virushaltige Suspension in Kryoröhrchen gefüllt und bei  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

### **3.2.6 Kultivierung unter Agar-Overlay**

Um sich schnell vermehrende Viren in ihrer Ausbreitung in der Zellkultur zu behindern, wurden mit Leukozyten beimpfte HEF- oder HENZ-Kulturen mit einem Agar-Overlay-Medium beschichtet.

Der einschichtige Zellrasen wurde mit 0,2 ml der Leukozytensuspension (bei hoher bzw. niedriger Zelldichte 0,1 bzw. 0,3 ml) beimpft, nach 48 Stunden das Medium entfernt und die Leukozyten so gut wie möglich mit frischem Medium vom Zellrasen

abgewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5 ml gebrauchsfertigem Agar-Overlay-Medium. 4 Tage später wurde mit frischem Agar-Overlay-Medium (2,5 ml pro 60 mm Schälchen) überschichtet, um eine weitere Ernährung der Zellkulturen sicher zu stellen.

Die Zellkulturen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert, verdächtige Plaques mittels Pasteurpipette ausgestanzt und auf frische HEF-Kulturen verbracht.

### **3.2.7 Chloroformbehandlung**

Zur Unterscheidung, ob unbehüllte oder behüllte Viren vorlagen, wurde die Empfindlichkeit gegenüber Chloroform überprüft. Dazu wurden bei den Isolaten 3274/96, 3393/96, L16/96, KK9/5/11/96, KK18/5/11/96 und KK22/5/11/96 HEF-Kulturen mit möglichst hohem Titer mittels Zellschaber geerntet, mit Ultraschall behandelt und bei 1000 g zentrifugiert. Zu 0,9 ml des Überstandes wurde 0,1 ml Chloroform gegeben und eine Stunde auf dem Rüttler geschüttelt. Nach einer 12stündigen Lagerung bei 4 °C wurde der chloroformbehandelte Überstand auf HEF-Kulturen verimpft und 10 Tage auf das Auftreten von zytopathischen Effekten mikroskopisch kontrolliert. Als Positivkontrolle dienten mit nicht chloroformierten Überstand beimpfte Zellkulturen.

Unbehüllte Viren zeigen sich durch die Chloroformbehandlung nicht beeinträchtigt, während behüllte Viren nicht mehr infektiös sind.

### **3.2.8 Kultivierung mit IUDR**

Das Pyrimidinanalogon IUDR hat einen hemmenden Einfluß auf die DNA-Synthese und kann deshalb zur Unterscheidung von DNA- und RNA-Viren verwendet werden.

Es wurden bei den Isolaten 3274/96, 3393/96, L16/96, KK9/5/11/96, KK18/5/11/96 und KK22/5/11/96 HEF-Kulturen mit möglichst hohem Titer nach Entfernung des Mediums die Zellen durch Zugabe von einigen Tropfen Trypsin-Versen vom Zellkulturgefäß gelöst und mit 1 ml BME resuspendiert. 0,2 ml der virushaltigen Suspension wurden auf

frische HEF-Kulturen verbraucht und 2 ml Zellkulturmedium mit und ohne Zusatz von IUDR (50 µg/ml) zugegeben.

### 3.2.9 Virusneutralisationstest

Der Virusneutralisationstest wurde nach der  $\beta$ -Methode durchgeführt, d.h. es wurde mit konstanter Virussuspension und Verdünnung der einzelnen Seren gearbeitet. Es wurden damit die den Puten-Herpesvirusstamm FC 126 (TAD<sup>®</sup> Marek vac L, LAH) neutralisierenden Antikörper quantitativ bestimmt.

In 96-Lochplatten (Microtest, Falcon) wurden in alle Löcher 25 µl BME vorgelegt. Danach wurden in die erste Zeile jeweils 25 µl der zu untersuchenden Seren gegeben und diese mittels elektrischer Pipette (Elektrapette) in  $\log_2$ -Stufen bis  $\log_2 = 8$  bzw. 12 verdünnt. Als Kontrollseren wurden ein Antiserum (Positivkontrolle) und ein SPF-Serum (Negativkontrolle) eingesetzt. Es folgte dann die Zugabe der Virussuspension, deren Dosis 100 KID<sub>50</sub> /25 µl entsprach. Zwei Spalten einer Platte dienten als Zellkontrolle und blieben aus diesem Grund ohne Serum und Virus. Die Platten wurden nach der Viruszugabe eine Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl frisch subkultivierter HEF-Suspension. Zur Kontrolle des Titers des eingesetzten Virus, wurde bei jedem Testansatz auf einer gesonderten Zellkulturplatte eine Virustitration mitgeführt.

Die Platten wurden bei 37 °C bebrütet und am Tag nach dem Testansatz auf das Auftreten toxischer Effekte bzw. Keimgehalt geprüft. Die Ablesung erfolgte nach 8 Tagen mit einem Lichtmikroskop bei 125-facher Vergrößerung. Als VN-Titer ( $\log_2$ ) gilt die höchste Serumverdünnungsstufe, bei der noch kein zytopathischer Effekt aufgetreten ist.

### **3.2.10 Aufarbeitung der Gewebeproben für die histologische Untersuchung**

#### **3.2.10.1 Fixierung der Gewebeproben**

Von in der Sektion entnommenen oder eingesendeten Gewebeproben wurden maximal 1x1 cm große Stücke in 8%igem Formalin fixiert.

#### **3.2.10.2 Einbettung in Paraplast**

Zur Einbettung wird ein formalinfixiertes Gewebestück in eine Einbettkassette mit perforiertem Metalldeckel überführt und für eine Stunde gewässert.

Die Einbettkassetten mit den Gewebestücken wurden dann in den Gewebeeinbettautomat Shandon Citadel 100 verbracht, wo die folgenden isopropanol- oder azetonhaltigen Becken durchlaufen wurden: Isopropanol 50%ig, Isopropanol 70%ig, Isopropanol 80%ig und Isopropanol 90%ig für jeweils 60 Minuten, dann 2x 90 Minuten Isopropanol 100%ig, danach 2x 90 Minuten Isopropanol/Azeton im Verhältnis 1:1 und abschließend 2x 60 Minuten in reinem Azeton. Es folgten zwei Becken mit flüssigem Paraffin (Paraplast Plus, Schmelzpunkt bei 60 °C), in welchen die Gewebestücke jeweils 60 Minuten verblieben.

Anschließend wurden die Gewebeproben in Paraplast eingeblockt (Histocenter, Shandon), bei Zimmertemperatur abgekühlt und anschließend mindestens 12 Stunden bis zur Anfertigung der Schnitte bei -20 °C gelagert.

#### **3.2.10.3 Anfertigung der Gewebeschnitte**

Mit einem Serienschnittmikrotom (Modell 2040 Autocut) wurden von den Paraplastblöckchen Schnitte mit einer Dicke von 4-6 µm angefertigt. Die Schnitte wurden in einem handwarmen Wasserbad mit einem Pinsel gestreckt und auf einen mit einem Tropfen Serum-Glycerin versehenen Objektträger aufgebracht. Nach Trocknung bei Raumtemperatur für etwa 1 Stunde, wurden die Objektträger für 2 Stunden in einen 56 °C warmen Inkubator verbracht damit das Paraffin schmelzen konnte.

#### **3.2.10.4 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

Die in die Färbereisätze der automatischen Färbemaschine einsortierten Objektträger wurden zuerst zweimal 10 Minuten mit Roti<sup>®</sup>-Histol entparaffinisiert. Nach der absteigenden Alkoholreihe mit 100%, 96%, 70%, 50% und 20%igem Alkohol und Aqua dest. für jeweils 5 Minuten, erfolgte die Kernfärbung mit Hämalaun-Gebrauchslösung für 10 Minuten. Anschließend wurde das überflüssige Hämalaun durch 10minütiges Waschen mit fließendem Wasser entfernt. Die Eosin Gegenfärbung mit 1%igem Eosin erfolgte 5 Minuten. Danach wurden die Präparate zweimal für jeweils 30 Sekunden in Aqua dest. gewaschen um dann die aufsteigende Alkoholreihe mit 70%, 96% und 100%igem Alkohol für jeweils 3 Minuten zu durchlaufen. Den Abschluß der Färbereihe bildeten zwei 10minütige Roti<sup>®</sup>-Histol-Bäder. Zur Eindeckelung wurden die Schnitte mit Corbit-Balsam betropft und mit Deckgläsern versehen.

#### **3.2.10.5 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Gefrierschnitte wurden von den formalinfixierten Nerven hergestellt, nachdem diese in Einbettkassetten für 1 Stunde gewässert wurden. Ein bis zu 2 cm langes Nervenstück wurde danach auf einem Objektisch in Gefrierschnitt-Einbettmedium gegeben und bei -23 °C im Kryostat (Modell 2800 Frigocut-E) tiefgefroren. Es wurden dann etwa 4-6 µm dicke Schnitte hergestellt, auf Objektträger verbracht und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte eine HE-Färbung wie unter 3.2.10.4 beschrieben.

#### **3.2.11 Präparation der DNA aus Gewebe- und Blutproben**

Zur Präparation der DNA wurde etwa 0,2 g Gewebe mit einem Einmalskapell möglichst fein zerkleinert. Nach Überführung des Gewebestreifens in ein Eppendorffgefäß folgte die Zugabe von 1,5 ml PBS, die Proben wurden etwa 30 Sekunden geschüttelt und anschließend bei 1000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde der Vorgang wiederholt. Zu dem gewaschenen Gewebe oder analog etwa 0,2 ml Leukozytensuspension wurde 1,5 ml Digestionspuffer und 150 µg

Proteinase K hinzugefügt, die Proben gut durchmischt und bei 37 °C 12 Stunden inkubiert.

Danach wurde jeweils 0,8 ml des verdauten Materials in ein weiteres Eppendorffgefäß überführt und 1:1 mit Phenol versetzt, gemischt bis eine Emulsion entstand und anschließend bei 3000 U/min 3 Minuten zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgehoben, in ein neues Eppendorffgefäß gegeben und 1:1 mit Phenol-Chloroform gemischt bis eine Emulsion entstand. Diese wurde bei 3000 U/min 3 Minuten zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde wiederholt, wenn der Überstand nicht klar war oder sich viel gefälltes Material in der Zwischenschicht befand. Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase in ein neues Eppendorffgefäß überführt und mit der zweifachen Menge 100%igem Ethanol und 1/10 der Menge NaAcetat versehen. Zur besseren Präzipitation wurden die Proben mindestens 4 Stunden bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde 20 Minuten bei 4500 U/min zentrifugiert, der Überstand entfernt und 1 ml 70%iges Ethanol zum DNA-Sediment gegeben. Das oft als kleines weißes Pellet sichtbare Sediment wurde aufgeschüttelt und die Probe 15 Minuten bei 4500 U/m zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Sedimente luftgetrocknet. Anschließend wurde die DNA in 50 oder 100 µl TE-Puffer gelöst.

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes erfolgte photometrisch. Zur Berechnung wurden die bei den Wellenlängen 260 und 320 nm erhaltenen Werte herangezogen:

$$c = (E_{260} - E_{320}) \times 50 \times \text{Verdünnung} \quad [\text{ng}/\mu\text{l}].$$

Durch entsprechendes Verdünnen mit TE-Puffer wurden die DNA-Gehalte auf 100 ng/µl Lösung eingestellt.

### **3.2.12 Vorbereitung der Oligonukleotidprimer für die PCR**

Die von der Firma MWG-Biotech AG, Ebersberg hergestellten Primer-Lyophilisate wurden mit TE-Puffer gelöst und entsprechend der Konzentrationsangaben der Herstellerfirma auf 100 pmol/µl verdünnt.

### 3.2.13 Reaktionsgemische für die PCR

Das Volumen der PCR-Reaktionsgemische betrug 50  $\mu$ l. Der Mastermix wurde aus den folgenden Komponenten zusammengestellt und in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:

#### MKV-PCR- Mastermix:

Endkonzentration (in 50  $\mu$ l Ansatz):

A.bidest.	37,8 $\mu$ l	
Reaktionspuffer (20x)	2,5 $\mu$ l	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 $\mu$ l	1,5 mM
dNTP's (25 mM)	0,4 $\mu$ l	0,2 mM
<i>Tfl</i> -Polymerase	0,5 $\mu$ l	0,5 Units
Primer A (MKV)	0,6 $\mu$ l	60 pmol
Primer B (MKV)	0,6 $\mu$ l	60 pmol

#### REV-PCR-Mastermix:

Der Mastermix für die REV-PCR wurde den Angaben für die MKV-PCR entsprechend - mit den für REV spezifischen Oligonucleotidprimern – hergestellt.

#### LPDV-PCR-Mastermix:

Endkonzentration (in 50  $\mu$ l Ansatz):

A.bidest.	36,9 $\mu$ l	
Reaktionspuffer (20x)	2,5 $\mu$ l	1x
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,0 $\mu$ l	1,5 mM
dNTP's (25 mM)	1,6 $\mu$ l	0,8 mM
<i>Tfl</i> -Polymerase	1,0 $\mu$ l	1,0 Unit
Primer A (LPDV)	1,0 $\mu$ l	100 pmol
Primer B (LPDV)	1,0 $\mu$ l	100 pmol

Nach guter Durchmischung der einzelnen Mastermix-Komponenten wurde unmittelbar vor Beginn des PCR-Thermocycler-Programms 2,5 (LPDV-PCR 3,0)  $\mu$ l Proben- bzw. Kontroll-DNA zugegeben. Zum Teil wurde aus labororganisatorischen Gründe anstelle

der *Tfl*-Polymerase die *Taq*-Polymerase und der zugehörige 10x Reaktionspuffer in den entsprechenden Konzentrationen eingesetzt.

### 3.2.14 Zyklusbedingungen der PCR

#### **MKV-PCR:**

Anfangs-Denaturierung:	95 °C	2 min	
	anschließend:		
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	55 °C	1 min	
Extension:	72 °C	3 min	35 Zyklen
	abschließend:		
verlängerte Extension:	72 °C	7 min	

#### **REV-PCR:**

Anfangs-Denaturierung:	94 °C	2 min	
	anschließend:		
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	55 °C	2 min	
Extension:	72 °C	1 min	30 Zyklen
	abschließend:		
verlängerte Extension:	72 °C	10 min	

#### **LPDV-PCR:**

Anfangs-Denaturierung:	95 °C	1 min	
	anschließend:		
Denaturierung:	94 °C	1 min	
Annealing:	55 °C	1 min	
Extension:	72 °C	1 min	31 Zyklen
	abschließend:		
verlängerte Extension:	72 °C	10 min	

### **3.2.15 Nachweis der PCR-Produkte durch analytische Agarose-Gel-Elektrophorese**

Zur Darstellung der DNA-Fragmente wurden nach Ablauf der PCR 12 µl des Reaktionsgemisches mit 3,0 µl Auftragepuffer versetzt. Vom MW-Standard wurden 2 µl ebenfalls mit 3 µl Auftragepuffer und 10 µl TAE-Puffer vermischt.

3,2 g Agarose wurden in 160 ml TAE-Puffer aufgekocht und nach Zugabe von 2 µl Ethidiumbromid auf dem Magnetrührer gemischt. Nach nochmaligem Aufkochen und anschließendem Abkühlen auf etwa 50 °C wurde das Gel in den entsprechenden Elektrophoreseschlitten gegossen. Das ausgehärtete Gel wurde nach Entfernen des Kammes in die mit TAE-Puffer beschickte Elektrophorese-Kammer gelegt und der MW-Standard und die PCR-Produkte in die Taschen des Gels einpipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 Volt bei einer Laufzeit von 60 Minuten.

Das mit vorhandener DNA interkalierende Ethidiumbromid ermöglichte die Visualisierung der DNA-Banden unter UV-Licht (254 nm). Die Größe der Amplifikate wurde durch direkten Vergleich mit dem MW-Standard ermittelt.

Die Protokollierung der Ergebnisse wurde entweder durch schriftliche Übernahme der gefundenen Amplifikate und ihrer Größe auf das PCR-Protokoll, mittels Fotografierung des auf einem UV-Illuminator liegenden Gels mit einer Spiegelreflexkamera oder durch eine CCD-Kamera mit Digitalisierung und Speicherung auf Datenträgern vorgenommen.

### **3.2.16 Nicht selbst durchgeführte Untersuchungen**

Ein Teil der histologischen Untersuchungen wurde vom Institut für Veterinär-Pathologie, Justus-Liebig-Universität, Gießen durchgeführt, wofür hiermit gedankt sei.

Serumproben aller Betriebe und Kloakentupfer aus Betrieb A wurden zur Fa. Lohmann Tierzucht GmbH, Cuxhaven gesendet und dort dankenswerterweise auf Antikörper gegen REV (ELISA), LLV, Subgruppe A, (ELISA), MKV (AGPT) und LLV P-27-Antigen (ELISA) untersucht.

Zwei Isolate (3758/96 in der 9. Passage und L16/96 in der 16. Passage) wurden an der Klinik für Geflügel, Tierärztliche Hochschule Hannover, mittels indirektem Immunfluoreszenztest näher untersucht, wofür hier gedankt sei. Dort wurden folgende monoklonale Antikörper zum fluoreszenzserologischen Nachweis von Virusantigen in der Zellkultur eingesetzt:

- 1.) 2 BN-90 zum Nachweis von MKV, Serotyp 1
- 2.) Y 5.9 zum Nachweis von MKV, Serotyp 2
- 3.) L 78.2 zum Nachweis von PHV.

Die Reagenzien wurden von Intervet UK Ltd. zur Verfügung gestellt.

Als Konjugat diente FITC - konjugiertes Ziege-Anti-Maus IgG (ganzes Molekül) in der Verdünnung 1:128 (Sigma Immunochemicals).

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Klinische Bilder erkrankter Puten**

Klinisch untersucht wurden Puten in den Betrieben A, B und E. Neben der Adspektion der Herden erfolgte die klinische Untersuchung einzelner Puten, die zufällig oder aufgrund sichtbarer Krankheitssymptome ausgewählt wurden. Einige der Puten mit äußerlichen Krankheitssymptomen konnten von uns für weiterführende Untersuchungen lebend in die Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität, Gießen verbracht werden. Zusätzlich wurden von den Tierhaltern der Betriebe A, B und E weitere lebende Puten in die Klinik gebracht. Insgesamt wurden 64 lebende Puten der Betriebe A, B und E in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische eingehend klinisch untersucht. Von diesen zeigten 29 Tiere klinische Symptome. Dabei ließen sich unterscheidbare Formen des Krankheitsbildes erkennen.

#### **4.1.1 Klinisch unspezifischer Verlauf bei Puten mit tumorösen Veränderungen**

Die Krankheitserscheinungen bei den betroffenen Puten waren überwiegend unspezifisch. Ein Teil der Tiere blieb in seiner Entwicklung zurück. Die erkrankten Tiere waren oft blaß, schwach und apathisch bis somnolent, hatten Durchfall und das Gefieder war häufig gestäubt und verschmutzt. Im weiteren Verlauf des Krankheitsgeschehens kamen die Tiere meist zum Festliegen, eine Lähmung der Gliedmaßen lag jedoch nicht vor.

#### **4.1.2. Asymptomatischer Verlauf bei Puten mit tumorösen Veränderungen**

Bei dieser Verlaufsform kam es bei gut entwickelten, älteren Puten zu plötzlichen Todesfällen. Auch gelangten einige Tiere ohne jegliche klinische Anzeichen und in guter Kondition zur Schlachtung, bei welcher tumorös veränderte Organe gefunden wurden.

#### **4.1.3 Spezifischer Verlauf bei Puten mit tumorösen Veränderungen**

Bei einer etwa 20 Wochen alten Pute des Betriebs B konnte eine echte Lähmung der Beine festgestellt werden. Das Tier war ansonsten in einem guten Zustand, zeigte Interesse an seiner Umgebung und nahm Wasser und Futter auf.

Eine 20 Wochen alte Pute des Betriebs A und mehrere 21 Wochen alte Puten des Betriebs E zeigten markante Hautveränderungen, v.a. im Bereich des Kopfes. Es handelte sich zum einen um eine Verdickung der Haut, die an diesen Stellen eine sehr derbe Konsistenz hatte. Zum anderen wurden erbsen- bis walnußgroße, derbe Zubildungen in der Haut gesehen (Abb. 1).

#### **4.1.4 Klinische Befunde bei Puten ohne tumoröse Veränderungen**

Aus Betrieb A wurde eine etwa 29 Wochen alte Pute mit hochgradiger Atemnot und zyanotischer Kopfhaut zur Sektion verbracht. Ein weiteres Tier dieses Bestandes zeigte im Alter von 12 Wochen eine starke Einschränkung seiner Beweglichkeit, welche sich auf eine Drehung um ca. 160° im rechten Tibiotarsalgelenk zurückführen ließ.

### **4.2 Pathologisch-anatomische Befunde**

78 Puten wurden auf das Vorliegen pathologisch-anatomischer Veränderungen untersucht. Es konnten bei 33 Tieren gering bis hochgradige Veränderungen, die für das Vorliegen einer tumorösen Erkrankung sprechen, gefunden werden. Bei 12 Puten waren die Befunde fraglich, bei 33 Tieren konnten keine Veränderungen oder durch eine andere Erkrankung verursachte Befunde erhoben werden. Die im Anhang befindliche Tabelle A gibt eine Übersicht über die Organe mit und ohne pathologisch-anatomische Veränderungen bei den untersuchten Puten.

#### **4.2.1 Pathologisch-anatomische Befunde bei Puten mit Tumoren**

Bei den Puten mit makroskopisch erkennbaren Veränderungen im Sinne einer tumorösen Erkrankung waren folgende Organe betroffen: 24x Leber, 22x Milz, 20x Nieren, 14x Magendarmtrakt, 13x Herz, 11x Lunge/Luftsäcke, 9x Schilddrüse, 7x

Nerven, 4x Thymus, 3x Subkutis, 3x Haut, 3x Serosen, 2x Knochenmark, 2x Muskulatur, 2x Pankreas, 1x Gehirn, 1x Nebennieren, 1x Bursa Fabricius und 1x Zäkaltonsillen.

Bei 12 der veränderten Lebern und bei 9 der veränderten Milzen fanden sich speckige Knoten oder Herde, deren Größe zwischen wenigen mm und mehreren cm im Parenchym variierte (Abb. 2-5). Dabei handelte es sich zum einen um solide Tumore, bei denen der nicht betroffene Anteil der Organe ein weitgehend physiologisches Aussehen behielt, in anderen Fällen war das gesamte Organparenchym diffus durchsetzt und keinerlei physiologische Struktur mehr erkennbar. 7 Lebern waren - teilweise bis zur doppelten physiologischen Größe - vergrößert. 14 Milzen waren vergrößert, dabei reichte das Spektrum von geringgradig vergrößert bis zum dreifachen ihrer physiologischen Größe (Abb. 6). 5 Milzen hatten ein marmoriertes Äußeres, bei 2 Milzen war die weiße Pulpa deutlich vergrößert. Bei 11 der Nieren konnten im Nierenparenchym bis zu etwa 5 mm große speckige Knoten gefunden werden, bei einer Niere fanden sich derbe, einige mm große Knoten aufsitzend. 11 Nieren waren - überwiegend geringgradig - vergrößert. Bei den 11 Veränderungen im Bereich der Lungen und Luftsäcke handelte es sich um Anzeichen einer bestehenden oder abgeheilten Entzündung wie fibrinöse Auflagerungen, käsige Massen im Lungenparenchym, schwartige Lungenbereiche etc.. In keinem Fall konnte im Bereich der Atemorgane tumoröse Veränderungen gefunden werden. Die Schwellung der Nerven (n = 8) wurde anhand der Aufhebung der typischen Querstreifung ermittelt. Es wurden vereinzelt (n = 3) knotige Verdickungen der Nerven beobachtet.

Die einzelnen Befunde sind in Tabelle 3 aufgelistet, dabei können pro Organ auch mehrere Veränderungen aufgetreten sein.

**Tabelle 3:** Übersicht über die pathologisch-anatomischen Veränderungen bei 33/78 untersuchten Puten mit tumorösen Veränderungen aus den Betrieben A, B und E

<b>Verändertes Organ</b>	<b>Befund (mehrfache Nennungen pro Tier möglich)</b>	<b>Anzahl</b>
Leber n = 24	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vergrößert</li> <li>• speckige Knoten/Herde</li> <li>• weißliche oder grünliche Stellen/Herde</li> <li>• verstärkte Läppchenzeichnung</li> <li>• brüchig</li> </ul>	7 12 7 3 2
Milz n = 22	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vergrößert</li> <li>• speckige Knoten/Herde</li> <li>• weiße Stellen/Herde (marmoriert)</li> <li>• weiße Pulpa deutlich vergrößert</li> </ul>	14 9 5 2
Nieren n = 20	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vergrößert</li> <li>• speckige Knoten/Herde</li> <li>• derbe Knoten aufsitzend</li> <li>• fibrinöse Beläge</li> </ul>	11 11 1 1
MDT <sup>1</sup> n = 14	<ul style="list-style-type: none"> <li>• speckige/derbe Zubildungen auf Darmserosa</li> <li>• Enteritis (fibrinös/hämorrhagisch/nekrotisch)</li> <li>• Petechien auf Darmschleimhaut</li> <li>• kleine, derbe Knoten auf Kropfschleimhaut</li> </ul>	5 8 (6/1/1) 3 1

## Fortsetzung Tabelle 3

Fortsetzung MDT n = 14	• tennisballgroße Verwachsung von Ileum, Zäkum und Pankreas	1
	• Zäkum mit weißen, derben Herden	2
	• speckige Zubildungen auf Drüsenmagen	1
	• Drüsenmagenschleimhaut gerötet	1
	• weiße Knötchen in Drüsenmagenmuskulatur	1
	• Drüsenmagenmukosa verdickt	1
Herz n = 13	• speckige Herde aufsitzend	2
	• Perikarderguß (klar/trüb)	5 (4/1)
	• Perikard verdickt	1
	• derbe Konsistenz des Muskels	1
	• abgerundet	3
	• Dilatation	2
Schilddrüse n = 9	• vergrößert	8
	• speckige Konsistenz	1
Nerven n = 7	• Plexus brachialis verdickt	3
	• Plexus brachialis mit knotiger Zubildung	1
	• N. ischiadicus verdickt	4
	• speckige Knoten entlang der peripheren Nerven (v.a. im Halsbereich)	1
	• verdickte periphere Nerven	1
	• weiße Knötchen entlang der Nerven des Gekröses	1

## Fortsetzung Tabelle 3

<b>Verändertes Organ</b>	<b>Befund (mehrfache Nennungen pro Tier möglich)</b>	<b>Anzahl</b>
Thymus n = 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>• vergrößert</li> <li>• dunkelrot</li> <li>• wabige Struktur</li> <li>• sehr klein</li> </ul>	2 1 1 1
Subkutis n = 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• knotige Zubildungen</li> <li>• gerötet</li> <li>• sulzig</li> </ul>	2 1 1
Haut n = 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• derbe Zubildungen auf der Haut v.a. im Bereich des Kopfes, Haut teilweise verdickt und derb</li> <li>• gerötet</li> <li>• zyanotisch</li> </ul>	1 1 1
Serosen n = 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polyserositis</li> <li>• knotige Zubildungen auf den Serosen</li> </ul>	2 1
Muskulatur n = 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• speckige Knoten auf/in der Muskulatur</li> </ul>	2
Pankreas n = 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• derber Knoten</li> <li>• blutige Herde</li> </ul>	1 1
Knochenmark n = 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>• hellrot, marmoriert</li> </ul>	2
Gehirn n = 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>• fibrinöse Auflagerungen und Petechien auf Hirnhäuten</li> </ul>	1

**Fortsetzung Tabelle 3**

<b>Verändertes Organ</b>	<b>Befund (mehrfache Nennungen pro Tier möglich)</b>	<b>Anzahl</b>
Nebennieren n = 1	• vergrößert	1
Zäkaltonsillen n = 1	• stark vergrößert	1
Bursa Fabricius n = 1	• Petechien innen	1

<sup>1</sup> MDT = Magen-Darm-Trakt

**4.2.2 Pathologisch-anatomische Befunde bei Puten ohne Tumoren**

Bei den Puten ohne makroskopisch erkennbare tumoröse Zubildungen fanden sich bei 12 Lebern Veränderungen, von denen allerdings 10 als fraglich eingestuft wurden. Bei diesen fraglichen Befunden handelte es sich überwiegend um Farbabweichungen der Organe, die Oberfläche erschien marmoriert oder es fanden sich gelbliche, weißliche, graue oder auch rotbraune Herde im Parenchym. Auch verstärkte Leberläppchenzeichnung, brüchiges Parenchym und blutige Bereiche wurden beobachtet. Bei den zwei Leberveränderungen, die nicht als fraglich eingestuft wurden, handelte es sich um eine vergrößerte und fleckige Leber und eine graue Leber mit 1-2 mm großen, weißen Herden im Parenchym. Beide Lebern stammten von Puten mit den Anzeichen einer bakteriellen Allgemeininfektion. Die 5 veränderten Milzen waren umfangsvermehrt, marmoriert oder die weiße Pulpa war vergrößert. Neben einer Perikarditis und einer hochgradigen Vorkammerdilatation, fand sich als fraglicher Herzbefund eine marmorierte Farbe des Muskels. Bei den 2 veränderten Nieren fanden sich grau-weiße Herde. Eine Pute mit vergrößerter Leber, Milz, Niere, Schilddrüse und Thymus zeigte Anzeichen einer Septikämie. Zwei Puten hatten Bezoare aus Futter- und Einstreupartikeln in den Drüsenmägen. Bei den Veränderungen im Bereich der Lungen und Luftsäcke (n = 13) handelte es sich meist um Anzeichen einer bestehenden oder

abgeheilten Entzündung wie z. B. fibrinöse Auflagerungen, käsige Massen im Lungenparenchym oder schwartige Lungenbereiche.

### **4.3 Pathohistologische Befunde**

Es wurden Organproben von 66 Puten aus den Beständen A, B, C und E histologisch untersucht. Bei 34 dieser 66 Puten waren makroskopisch sichtbare Tumoren in den Organen vorhanden. Eine Übersicht über die Ergebnisse der histologischen Untersuchung bei den einzelnen Puten findet sich im Anhang in der Tabelle B.

Die histologische Untersuchung ergab sowohl herdförmige, als auch diffuse Infiltrationen der Organe. Es handelte sich um pleomorphe Zellinfiltrationen, hauptsächlich mit mononukleären Zellen. In erster Linie fanden sich Lymphozyten und Lymphoblasten, sowie wenige eingestreute Retikulumzellen und Makrophagen. Gelegentlich konnten auch Plasmazellen und Granulozyten entdeckt werden. In manchen Präparaten waren hohe Mitoseraten und auch pyknotische Zellen zu sehen. In anderen Präparaten konnte eine Verdrängung der physiologischen Organstruktur zugunsten der Infiltrate beobachtet werden.

#### **4.3.1 Pathohistologische Befunde bei Puten mit Tumoren**

Bei den histologisch untersuchten Lebern von Puten mit makroskopisch sichtbaren Tumoren fanden sich in 19 von 30 Präparaten deutliche Veränderungen wie unter 4.3 beschrieben (Abb. 7). Bei 2/30 Lebern waren die Veränderungen sehr geringgradig und wurden als fraglich eingestuft. 18 von 21 untersuchten Milzen zeigten Zellbildveränderungen wie unter 4.3 beschrieben, 1/21 Milzen wurde als fraglich befundet. Bei den 29 mikroskopisch beurteilten Nieren von Puten mit makroskopisch sichtbaren Tumoren fanden sich in 20 Nierenpräparaten Veränderungen wie unter 4.3 beschrieben. Im Schnittbild einer Niere waren neben einer deutlichen Infiltration mit mononukleären basophilen Zellen die Glomerula teilweise papilliform und miteinander verwachsen.

Von 24 Puten mit Tumoren wurden Plexus brachialis und/oder Nervus ischiadicus und evtl. andere veränderte Nerven histologisch beurteilt. Bei 6 Tieren wurden eindeutige Veränderungen gefunden, es handelte sich meist um wenige kleine lymphoide, interfibrillär gelegene Zellen, teilweise konnte eine ödematöse Auflockerung gesehen werden. Lediglich bei einem Präparat waren die Veränderungen ausgeprägter, es fanden sich eine starke Infiltration mit Lymphozyten und eine ödematöse Auflockerung der Struktur (Abb. 8). Bei 4 Nervenpräparaten wurde ein fraglicher Befund erhoben. Eines von 2 untersuchten Herzpräparaten wies eine geringgradige Infiltration mit Lymphozyten und Lymphoblasten auf. Weiterhin fanden sich solche infiltrativen Veränderungen in 5/5 Darmschnitten, 4/4 Drüsenmagenschnitten, 0/3 Gehirnschnitten, 6/8 Schilddrüsen Schnitten, 2/2 Hautschnitten und bei 1/1 Subkutisschnitten. Eine histologisch untersuchte Knochenmarksprobe ergab eine herdförmige Infiltration mit unreifen, vermutlich leukotischen Zellen. 2/3 Thymuspräparate zeigten histologische Veränderungen. Bei einem dieser Präparate fanden sich keine follikuläre Strukturen mehr, bindegewebige Septen durchzogen das stark vaskularisierte und mit mononukleären Zellen infiltrierte Organ. Eines von zwei untersuchten Bursa Fabricius-Präparaten wies Veränderungen im Sinne einer Atrophie des Organs auf.

Bei allen 34 Puten mit makroskopischen Veränderungen im Sinne einer tumorösen Erkrankung, konnten diese Veränderungen histologisch verifiziert werden.

#### **4.3.2 Pathohistologische Befunde bei Puten ohne Tumoren**

Bei 32 Puten ohne makroskopisch sichtbare Tumoren wurden histologische Untersuchungen durchgeführt. Dabei konnten bei einem von 32 untersuchten Leberpräparaten Veränderungen wie unter 4.3 beschrieben gefunden werden, die Veränderungen wurden als positiv im Sinne des Vorliegens lymphoider Mikrotumoren befundet. Bei zwei weiteren Leberpräparaten wurden fragliche Befunde hinsichtlich des Vorliegens solcher Zellveränderungen erhoben. Es handelte sich dabei um sehr geringgradige Infiltrationen mit Lymphozyten. Bei keiner der 30 histologisch beurteilten Nieren konnten Veränderungen wie sie unter 4.3 beschrieben sind gesehen werden. Eine der drei untersuchten Milzen wurde als fraglich eingestuft, es fanden sich Sekundärfollikel und abgegrenzte Areale mit Lymphozyten, Lymphoblasten und

Plasmazellen. 3 der 32 untersuchten Puten wiesen in den Nervenpräparaten histologisch geringstgradige Veränderungen wie unter 4.3.1 beschrieben auf, sie wurden als fraglich eingestuft. Ein N. ischiadicus-Präparat wurde als positiv beurteilt, es fanden sich v.a. in Gefäßnähe einige Herde mit mononukleären Zellen. Dieses Nervenpräparat stammte von der selben Pute, deren Leberpräparat ebenfalls als positiv beurteilt worden war. Somit konnten bei einer Pute, die in der pathologisch-anatomischen Untersuchung keine tumorösen Veränderungen aufwies, ebensolche histologisch nachgewiesen werden. Bei einem in der Sektion als marmoriert beschriebenen Herzen konnte in der histologischen Untersuchung keine Veränderung festgestellt werden, ebenso war die histologische Untersuchung eines Pankreas ohne besonderen Befund.

#### 4.4 Virologische Befunde

Es wurden 304 Organ- und Blutproben von Puten aus den Beständen A, B, C und E virologisch untersucht. Bei 44 der untersuchten Organ- und Blutproben von Puten aus den Beständen A und B konnte ein zytopathischer Effekt (cpE) in der Zellkultur gefunden werden (Tab. 4). Der cpE trat lediglich nach der Inokulation peripherer Blutleukozyten auf, alle untersuchten Organproben blieben negativ.

**Tabelle 4: Übersicht über positive Ergebnisse der virologischen Untersuchungen**

Bestand	Tagebuchnummer	Art der Zellkultur
A	3274/96	HEF
A	3277/96	HEF
A	3393/96	HEF
A	3394/96	HEF
A	3395/96	HEF

**Fortsetzung Tabelle 4**

<b>Bestand</b>	<b>Tagebuchnummer</b>	<b>Art der Zellkultur</b>
A	L13 und L16/96	HEF
A	3758/96	HEF
A	KK 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 35, 38, 40, 42, 44/96	HEF
B	2291/1-2/97	HENZ
B	2291/7-9/97	HENZ

Der cpE zeigte sich meist 4 Tage p.i. in Form einiger abgerundeter Zellen im Zellrasen. Innerhalb der nächsten 2-3 Tage vergrößerten sich die Plaques stark, Einzelzellen und Synzytien lösten sich aus dem Zellrasen. Es bildeten sich zahlreiche sekundäre cpE in den Kulturen.

Damit im Falle des Vorhandenseins eines Virus seine starke Ausbreitung unterbunden würde, wurde bei den Proben von 2291/1-9/97, 1899/00 und K807/1-4/00 ein Agar-Overlay über die infizierten HENZ gegeben. Die Proben von 1899/00 und K807/1-4/00 wurden zusätzlich auf EEF verimpft. Sowohl die Organ- als auch die Leukozytenproben von 1899/00 und die Leukozyten der Tgb.-Nr. K807/1-4/00 blieben negativ. Die verdächtigen Stellen (kleine Plaques mit runden Zellen) der Leukozytenproben von 2291/1-2 und 7-9/97 wurden ab dem 7. Tag p.i. vorsichtig mittels Pasteurpipette ausgestanzt und auf frische HEF übertragen. Innerhalb von 2-3 Tagen waren diese mit dem bereits beschriebenen cpE versehen.

Mittels Immunfluoreszenztest wurden die Isolate L16/96 und 3758/96 als Puten-Herpesvirus identifiziert. Alle anderen Isolate zeigten den gleichen cpE und ein ähnliches Wachstumsverhalten und wurden anhand dieser morphologischen Kriterien ebenfalls als Puten-Herpesvirus identifiziert.

Durch die Chloroform- bzw. IUDR-Behandlung der Isolate 3274/96, 3393/96, L16/96, KK 9/5/11/96, KK 18/5/11/96 und 22/5/11/96 kam es zu einer vollständigen Zerstörung ihrer Infektiösität. Die nichtbehandelten Kontrollproben zeigten einen zytopathischen Effekt.

Der Nachweis von LLV-Antigen p 27 in Putenkloakentupfern verlief negativ.

#### 4.5 Serologische Befunde

Der Virusneutralisationstest zeigte die Anwesenheit von Antikörpern gegen Puten-Herpesviren in den damit untersuchten 48 Seren. Die PHV-Titer lagen zwischen  $\log_2 = 2$  und  $\log_2 = >8$ . Bei 10 weiteren Seren, welche mittels AGPT auf das Vorliegen von PHV-Antikörpern untersucht wurden, konnten keine Antikörper nachgewiesen werden. 52 Seren wurden auf das Vorliegen von Antikörper gegen MKV (AGPT), LLV (ELISA) und REV (ELISA) untersucht. Es konnten keine Antikörper gegen REV, LLV, Subgruppe A, oder MKV nachgewiesen werden.

Tabelle 5 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen.

**Tabelle 5: Übersicht über die Ergebnisse der serologischen Untersuchungen**

Nr.*	Bestand	LLV <sup>1</sup> ELISA	REV <sup>2</sup> ELISA	MKV AGPT	PHV AGPT	PHV <sup>3</sup> VNT
2713/96	A	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
2714/96	A	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
3003/B/96	A	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
3004/1-5 u. 7-9/96	A	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
3274/96	A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	pos
3275/96	A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	pos

Fortsetzung Tabelle 5

Nr.*	Bestand	LLV <sup>1</sup> ELISA	REV <sup>2</sup> ELISA	MKV AGPT	PHV AGPT	PHV <sup>3</sup> VNT
3276/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3277/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3393/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3394/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3395/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3658/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3659/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3660/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
3758/96	A	neg	neg	neg	n.d.	pos
KK 1- 44/97	A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	pos
2291/1- 9/97	B	neg	neg	neg	neg	n.d.
2277/97	C	neg	neg	neg	neg	n.d.
1899/00	E	neg	neg	neg	n.d.	n.d.
K 807/1- 15/00	E	neg	neg	neg	n.d.	n.d.

\*Tagebuchnummern der untersuchten Seren (Nummer/Jahr)

pos = positiv

neg = negativ

n.d. = nicht durchgeführt

<sup>1</sup> bei dem LLV-ELISA lagen die Titer der Standard-Sollwerte der Positivkontrollen zwischen 2235 und 2346 ELISA-Einheiten

<sup>2</sup> bei dem REV-ELISA lagen die Titer der Standard-Sollwerte der Positivkontrollen zwischen 2095 und 2487 ELISA-Einheiten

<sup>3</sup> das beim PHV-VNT mitgeführte positive Kontrollserum erbrachte einen PHV-Titer von  $\log_2 = 6$ , das mitgeführte negative Kontrollserum erbrachte einen PHV-Titer von  $\log_2 = 0$

#### 4.6 Ergebnisse der PCR

Zum Nachweis, ob in den Leukozyten, Organ- und Tumorgewebe MKV-DNA vorlag, wurde mit den von SILVA et al. (1992) beschriebenen Oligonukleotidprimern gearbeitet. Diese flankieren die 132-bp repeat region und ermöglichen neben dem Nachweis von Serotyp 1 MKV-DNA auch die Unterscheidung, ob eine Infektion mit onkogenen oder attenuierten Stämmen vorliegt. Die als Positivkontrollen zur Verfügung stehende Puten-MKV-DNA und die DNA des Stammes „Italia“ erbrachten ein Amplifikationsprodukt von 317 bp, was einem Vorliegen von zwei Kopien der 132-bp repeat region entspricht. Die EcoRI verdaute GA-DNA zeigte Amplifikationsprodukte von 185 und 449 bp (1 und 3 Kopien).

Es wurde DNA extrahiert aus Leukozyten, Blut-, Organ- und Tumorproben von 36 Puten mittels PCR auf das Vorliegen einer MKV-Infektion untersucht. Bei 12 dieser so untersuchten Puten konnte MKV-DNA nachgewiesen werden (Abb. 9 und 10). Es fanden sich Amplifikationsprodukte von 317 bp bei den Proben von Betrieb A, B, C und E. Die Proben von Farm D erbrachten Amplifikate von 449 bp. Bei den 9 Leukozytenproben aus Betrieb B konnte nur in einer Probe MKV-DNA nachgewiesen werden. Die Gewebeproben von zwei dieser Puten waren MKV-positiv, während die peripheren Leukozyten ein negatives Ergebnis erbrachten.

Bei der PCR zum Nachweis des Vorliegens von REV-Provirus-DNA wurden Oligonukleotidprimer nach DAVIDSON et al. (1996) eingesetzt. Diese sind modifiziert nach den von ALY et al. (1993) erstmals eingesetzten Primern und enthalten Sequenzen der LTR-Region des REV. Sie sind trotz bestehender Unterschiede in den LTR-Sequenzen der verschiedenen REV universell zum Nachweis einer REV-Infektion einsetzbar. Die PCR zum Nachweis von REV-DNA erbrachte lediglich bei der Kontroll-DNA das erwartete Amplifikationsprodukt von 291 bp. Die mittels PCR untersuchte DNA extrahiert aus Leukozyten, Blut-, Organ- und Tumorproben von 29 Puten lieferte in allen Fällen ein negatives Ergebnis (Abb. 11).

Zur Abklärung, ob eine Infektion mit LPDV bei den untersuchten Puten vorlag, wurde aus Leukozyten, Organ- und Tumorgewebe von 29 Tieren extrahierte DNA unter

Anwendung der von DAVIDSON (1996) beschriebenen Oligonukleotidprimer, die Sequenzen aus der LTR-Region des LPDV-Provirus entsprechen, mittels PCR untersucht. Die als Positivkontrolle zur Verfügung stehende DNA, extrahiert aus einer Milz einer LPDV-infizierten Pute, erbrachte in der PCR das erwartete Ergebnis von 303 bp. Alle untersuchten Proben lieferten ein negatives Ergebnis (Abb. 12).

**Tabelle 6:** Übersicht über die Ergebnisse der PCR

Bestand	Nr <sup>1</sup>	MKV		REV		LPDV	
		Material	Ergebnis	Material	Ergebnis	Material	Ergebnis
A	196/97	Lu <sup>2</sup> , Mi, Le, Blut, He	pos	Lu, Mi, Le, Blut	neg	Mi, Le	neg
A	KK 1/97	Le, Mi	pos	Mi	neg	LeMi <sup>3</sup>	neg
A	KK 3, 5, 7, 8, 10,13, 15, 17, 24, 26, 27, 30, 33,35,38,39/97	jeweils LeMi <sup>3</sup>	neg	jeweils LeMi	neg	jeweils LeMi	neg
A	KK 16, 34/97	jeweils LeMiNi	neg	jeweils LeMiNi	neg	jeweils LeMiNi	neg
A	KK 22/97	Ni, Le, Sd	pos	Le, Ni	neg	Le, Mi	neg
A	KK29/97	LeMiNi	pos	LeMiNi	neg	LeMiNi	neg
B	2291/1-2/97	Leuko	neg	Leuko	neg	n.d.	
B	2291/3/97	Leuko	pos	n.d.		n.d.	
B	2291/4-9/97	Leuko	neg	n.d.		n.d.	
B	2291/1/97	Le, Mi, Th, Pank	pos	Le, Mi, Th, Pank	neg	Mi	neg
B	2291/2/97	Mi, Le	pos	Le, Mi	neg	Le, Mi	neg

**Fortsetzung Tabelle 6**

Bestand	Nr <sup>1</sup>	MKV		REV		LPDV	
		Material	Ergebnis	Material	Ergebnis	Material	Ergebnis
<b>C</b>	<b>2277/97</b>	Le, Mi, Ni, Leuko	<b>pos</b>	Le, Mi, Ni, Leuko	<b>neg</b>	Mi, Leuko	<b>neg</b>
<b>D</b>	<b>608/98</b>	Le, Mi	<b>pos</b>	Le, Mi	<b>neg</b>	Le, Mi	<b>neg</b>
<b>E</b>	<b>1278/00</b>	Le, Ni, Mi	<b>pos</b>	NiMi	<b>neg</b>	NiMi	<b>neg</b>
<b>E</b>	<b>1409/00</b>	Le, Ni, Mi	<b>pos</b>	Le,NiMi	<b>neg</b>	Le, NiMi	<b>neg</b>
<b>E</b>	<b>1473/00</b>	Le, Mi	<b>pos</b>	Le, Mi	<b>neg</b>	Le, Mi	<b>neg</b>

<sup>1</sup> **Tagebuchnummern** (Nummer/Jahr)

<sup>2</sup> **Abkürzungen** der untersuchten Organe: Le = Leber, Mi = Milz, Ni = Niere, Th = Thymus, Pank = Pankreas, Sd = Schilddrüse, Leuko = Leukozyten, He = Herz, Lu = Lunge

<sup>3</sup> Organe ohne Komma aufgelistet: DNA-Pool

**n.d.** = nicht durchgeführt

#### **4.7 Übersicht über die Befunde der auf Betrieb A zeitgleich eingestellten mit CVI 988 geimpften und ungeimpften Puten**

Um zu überprüfen, ob eine Impfung gegen die Mareksche Krankheit zu einer Reduzierung der hohen Tierverluste in Betrieb A führt, wurden 28 Puteneintagsküken in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische der Justus-Liebig-Universität, Gießen mit Nobilis<sup>®</sup>Rismavac (Intervet, Ch-B.96D25A) geimpft. Bis zum Alter von 13 Tagen wurden die 28 geimpften Putenküken und weitere 24 ungeimpfte Putenküken des selben Schlupfes räumlich voneinander getrennt, in einer ansonsten putenfreien Umgebung, auf dem Kliniksgelände gehalten. In dieser Zeit starben 13 Tiere aufgrund von Kannibalismusproblemen (10) und Dottersackentzündungen (3).

Von den am 17.10.1996 in den Betrieb A verbrachten geimpften (21) und ungeimpften (18) Puten wurden 31 Puten am 24.01.1997 geschlachtet, alle Tiere waren zum

Zeitpunkt der Schlachtung klinisch gesund. Bis zum Schlachttag starben - bzw. wurden wegen sehr schlechtem Allgemeinbefinden getötet - 4 ungeimpfte und 4 geimpfte Tiere. Bei 7 der 18 ungeimpften und 4 der 21 geimpften Puten konnten Veränderungen typisch für die MK gefunden werden. Von den Tieren die vor dem Schlachttag gestorben sind bzw. getötet wurden, konnte bei 2 der ungeimpften und 2 der geimpften Puten das Vorliegen der MK ausgeschlossen werden. Bei einem ungeimpften Tier konnten neben einer Nervenveränderung hochgradige entzündliche Veränderungen der Serosen, des Perikards und der Meningitiden festgestellt werden. Eine geimpfte Pute wies neben Veränderungen, die für das Vorliegen der MK sprachen, eine Rechtsherzdilatation und eine Polyserositis auf. Bei den Tieren die klinisch gesund zur Schlachtung gelangten waren die pathologisch-anatomischen Veränderungen geringgradig. Die deutlichsten Veränderungen im Sinne der Marekschen Krankheit konnten bei den Puten KK 9/97 und KK 22/97, welche aufgrund sehr schlechten Allgemeinbefindens getötet wurden, gefunden werden.

**Tabelle 7: Übersicht über die Untersuchungsergebnisse der bis zum Schlachttag gestorbenen/getöteten Puten bzw. der geschlachteten Puten mit Befunden typisch für das Vorliegen einer MK**

<b>Nr.<sup>1</sup> Todesart/-datum</b>	<b>Organe mit makroskopischen Veränderungen</b>	<b>Histo</b>	<b>PCR MKV</b>
<i>KK 1/97 gestorben/15.01.97</i>	<i>Mi<sup>2</sup>, (Le)<sup>3</sup>, He, Ne, Ge, Lu/LS (Perikarditis, Meningitis, Polyserositis, verdickter Nervus ischiadicus)</i>	<i>Le obB, Ni +, Ne (+)</i>	<i>Le, Mi +</i>
<i>KK 2/ 97 gestorben/21.10.96</i>	<i>Ma (Bezoar im DM)</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>KK 5/97 geschlachtet/24.01.97</i>	<i>ca. 2 cm großer Tumor in Le, Lu/LS</i>	<i>Le +, Ni, Nerv obB</i>	<i>LeMi<sup>4</sup> neg</i>

Fortsetzung Tabelle 7

Nr. <sup>1</sup> Todesart/-datum	Organe mit makroskopischen Veränderungen	Histo	PCR MKV
KK 6/97 gestorben/21.10.96	Ma (Bezoar)	n.d.	n.d.
KK 8/97 geschlachtet/24.01.97	<i>Le fraglich (hell marmoriert), Lu/LS</i>	<i>Le +, Ne +</i>	<i>LeMi neg.</i>
KK 9/97 getötet/01.01.97	<i>Le mit derben hellen Herden, Mi mit ca. 2 mm großen speckigen Herden, Ni mit linsengroßem Tumor, (He), Kropf, DM, Th, Sd</i>	<i>Le, Mi, Ni, Kropf, DM, Th und Sd +, Ne obB</i>	n.d.
KK 14/97 geschlachtet/24.01.97	<i>Ni mit ca. 2 mm großen speckigen Herden</i>	<i>Ni+, Le obB, Ne (+)</i>	<i>LeMi neg</i>
KK 16/97 geschlachtet/24.01.97	<i>Ni mit 1-2 mm großen weißen Herden, Lu/LS</i>	<i>Ni +, Le obB</i>	<i>LeMiNi neg</i>
KK 17/97 geschlachtet/24.01.97	<i>Le 1-2 mm gr, erhabene weißliche Herde, Th, Sd, Lu/LS</i>	<i>Le, Ni +, Ne (+)</i>	<i>LeMi neg</i>
*KK 21/97 geschlachtet/24.01.97	<i>graue Herde in Le, Ni mit kleiner schwartiger Stelle, He</i>	<i>Le, Ni +, Ne obB</i>	n.d.
*KK 22/97 getötet/24.12.96	<i>Le vergrößert mit linsengroßen Tumoren, Mi, (Ni), (Sd)</i>	<i>Le, Ni +, Ne obB</i>	<i>Le, Ni, Sd +</i>
*KK 23/97 gestorben/23.01.97	<i>Le mit 1-2 mm großen derben Herden im Parenchym, Mi, He, (Ni), Th, Lu/LS (Polyserositis, Rechtsherzdilatation)</i>	<i>Le+, Ne obB</i>	n.d.

Fortsetzung Tabelle 7

Nr. <sup>1</sup> Todesart/-datum	Organe mit makroskopischen Veränderungen	Histo	PCR MKV
*KK 27/97 gestorben/15.01.97	Le, Mi, He, Th, Sd, Lu/LS, (Verdacht auf Septikämie)	Le, Ni, Ne obB	LeMi neg
*KK 25/97 getötet/24.12.96	Beinverdrehung rechts	Le, Ni, Ne obB	n.d.
*KK29/97 geschlachtet/24.01.97	<i>Mi vergrößert, Ni kleine helle schwartige Bereiche</i>	<i>Ni+, Le, Ne obB</i>	<i>LeMiNi +</i>

<sup>1</sup> **Tagebuchnummern** (Nummer/Jahr)

<sup>2</sup> **Abkürzungen:** Mi = Milz, Le = Leber, Ni = Niere, He = Herz, Ne = Nerven, Ge = Gehirn, Lu/LS = Lunge/Luftsäcke, Ma = Mägen, DM = Drüsenmagen, Th = Thymus, Sd = Schilddrüse

<sup>3</sup> ( ) = fraglicher Organbefund

<sup>4</sup> Organe ohne Komma aufgelistet: DNA-Pool

\***geimpft** am 1. Lebenstag mit 0,2 ml Nobilis<sup>®</sup>Rismavac (Intervet) s.c.

**kursiv** die Puten, bei denen die pathologisch-anatomischen bzw. die histologischen Befunde Hinweise für das Vorliegen einer MK gegeben haben

+ = positiv (bei der histologischen Untersuchung positiv im Sinne von Veränderungen wie sie durch das MKV verursacht werden),

(+) = fraglich positiv bzw. nur sehr geringe Veränderungen,

**neg** = negativ

**obB** = ohne besonderen Befund

**n.d.** = nicht durchgeführt



**Abb. 1**  
**Hauttumoren im Bereich des Kopfes und der Kopfhänge einer**  
**21 Wochen alten Pute aus Betrieb E**



**Abb. 2**  
**Leber einer 20 Wochen alten Pute aus Betrieb B mit deutlicher**  
**Umfangvermehrung des gesamten Organs, teilweise knotige Strukturen**  
**und Aufhellung des Parenchyms erkennbar**



**Abb. 3**  
**Leber einer 17 Wochen alten Pute aus Betrieb A mit zahlreichen bis zu 3 cm großen Tumoren im gesamten Organ**



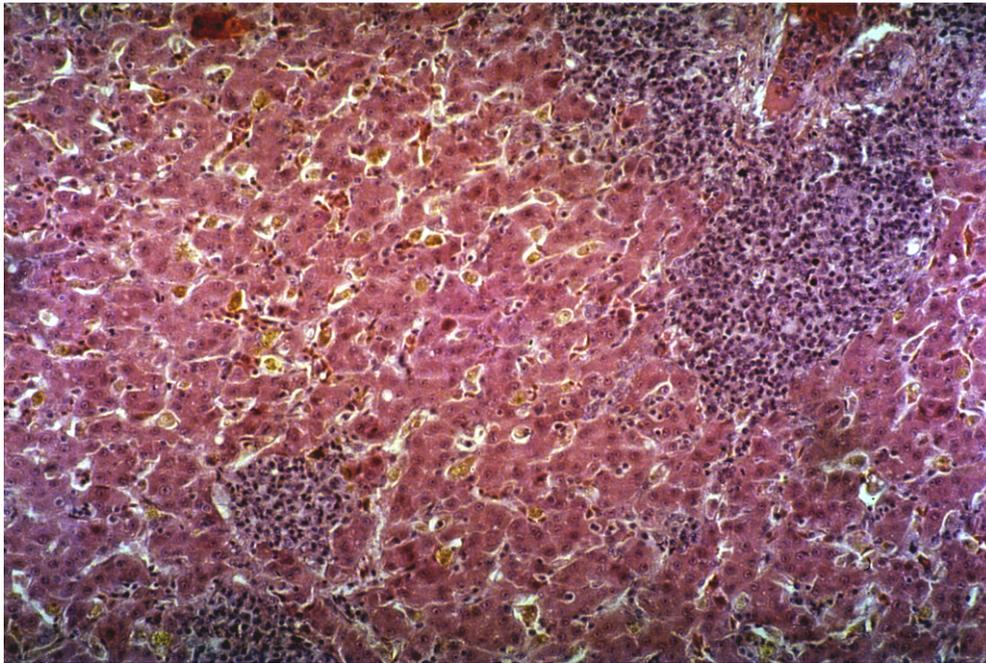
**Abb. 4**  
**Milz einer 24 Wochen alten Pute aus Betrieb A mit einem ca. 3x2 cm großen Tumor, im Anschnitt im Milzparenchym zahlreiche ca. 1-3 mm große weißliche Knötchen erkennbar**



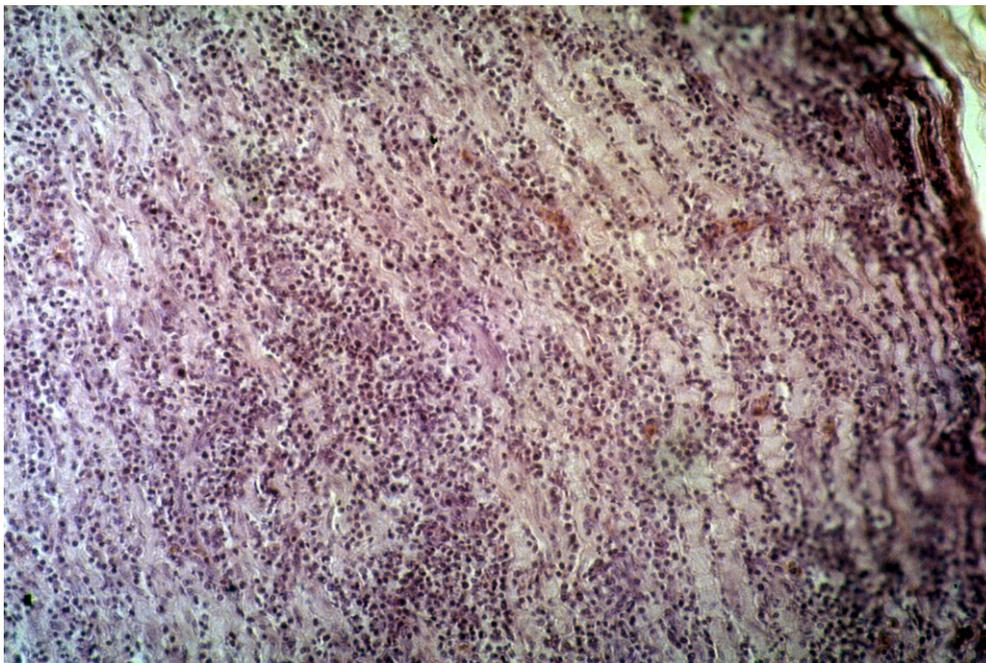
**Abb. 5**  
**Milz einer 13 Wochen alten Pute aus Betrieb A. Stark vergrößertes Organ mit zahlreichen speckigen, teilweise konfluierenden Tumoren**



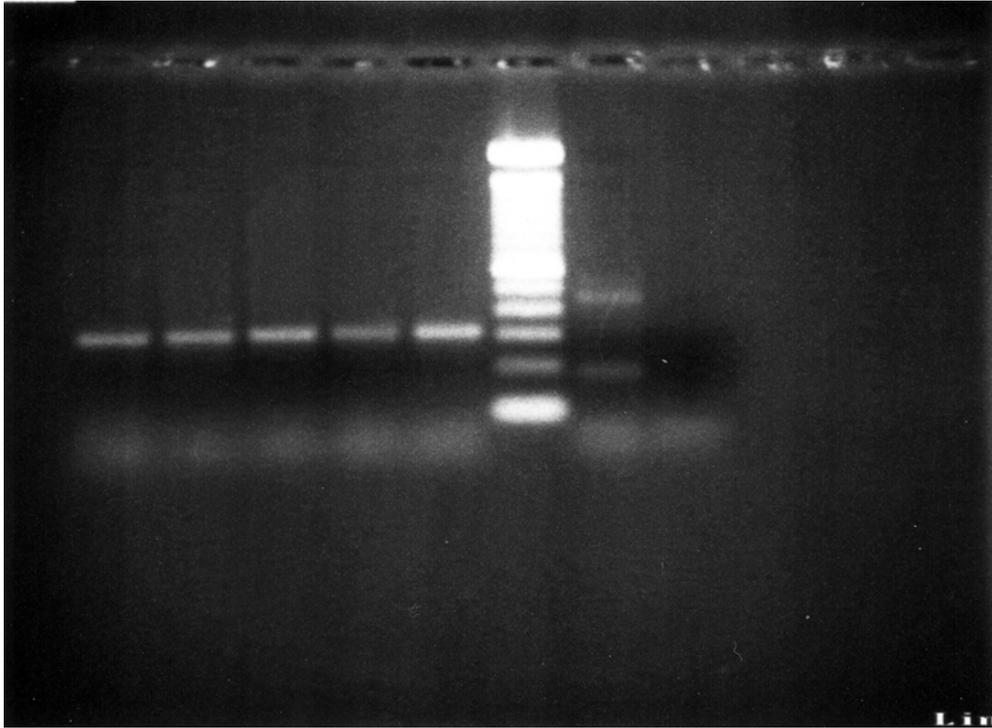
**Abb. 6**  
**Milzen aus zwei 20 Wochen alten Puten aus Betrieb B, untere Milz physiologische Größe, obere Milz ca. 3fach vergrößert**



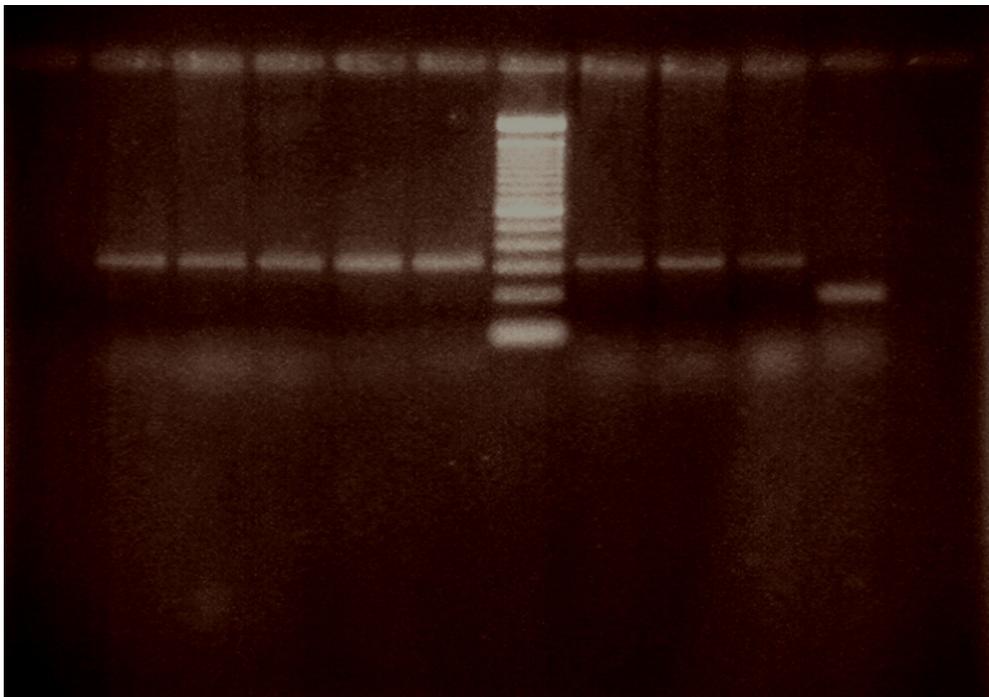
**Abb. 7**  
**Histologisches Präparat (H.E.-Färbung) einer Leber von einer 20 Wochen alten Pute aus Betrieb B, Mikrotumore mit pleomorphem mononukleären Zellbild, Zellen der lymphatischen Reihe dominieren**



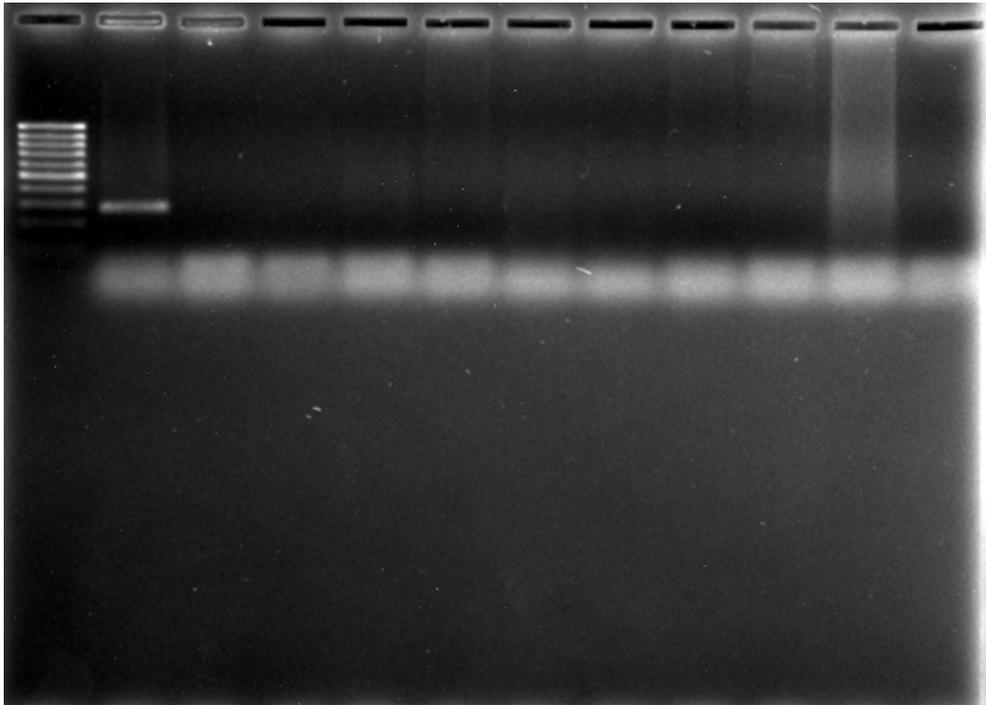
**Abb. 8**  
**Histologisches Präparat (H.E.-Färbung) eines Nervus ischiadicus einer 20 Wochen alten Pute aus Betrieb B, massive Infiltration mit lymphatischen Zellen**



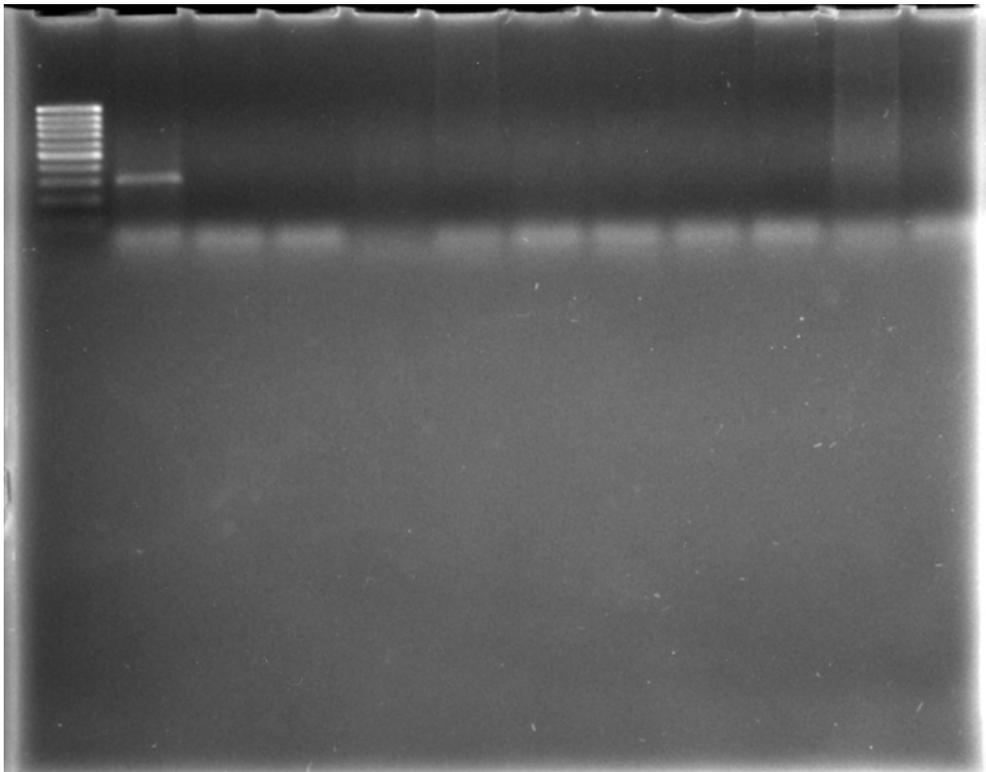
**Abb. 9**  
 MKV-PCR: Slot 2-6 Leber, Blut, Herz, Milz und Lunge von Pute 196/97 aus Bestand A, Banden bei 317 bp; slot 7 100-bp-ladder; slot 8 Positivkontrolle (EcoRI verdaute GA-DNA), Banden bei 185 und 449 bp; slot 9 Negativkontrolle



**Abb.10**  
 MKV-PCR: Slot 1 Negativkontrolle; slot 2-5 jeweils Leber und Milz von den Puten 2291/1 und 2/97 aus Bestand B, Banden bei 317 bp; slot 6 Positivkontrolle (MKV-Stamm „Italia“), Bande bei 317 bp; slot 7 100-bp-ladder; slot 8-10 Leber, Milz Niere von Pute 2277/97 aus Bestand C, Banden bei 317 bp; slot 11 Positivkontrolle (EcoRI verdaute GA-DNA), Bande nur bei 185 bp sichtbar



**Abb. 11**  
**REV-PCR: Slot 1 100-bp-ladder; slot 2 Positivkontrolle, Bande bei 291 bp; slot 3-11 Proben aus den Beständen A, B, C, D und E, alle negativ; slot 12 Negativkontrolle**



**Abb.12**  
**LPDV-PCR: Slot 1 100-bp-ladder; slot 2 Positivkontrolle, Bande bei 303 bp; slot 3-11 Proben aus den Beständen A, B, C, D und E, alle negativ; slot 12 Negativkontrolle**

## 5 DISKUSSION

Virusinfektionen stellen die häufigste Ursache für das Auftreten von Tumoren beim Geflügel dar. Sie führen schon bei jungen Tieren zu hoher Morbidität und teilweise auch zu hoher Mortalität. Das Auftreten nichtviral induzierter Tumore wird dagegen selten beobachtet. Dies scheint v.a. an der durchschnittlich sehr kurzen Lebenszeit der Tiere zu liegen (REECE, 1997).

Natürlich auftretende, viral bedingte Tumore bei Puten wurden bisher ursächlich dem Retikuloendotheliosevirus (REV) oder dem Virus der Lymphoproliferativen Krankheit der Pute (LPDV) zugeordnet. Seit COUDERT et al. (1995) das Auftreten einer tumorösen Form der Marekschen Krankheit (MK) bei Mastputen nachwies, kommt es immer wieder zu Berichten über das Auftreten der MK bei Puten (DAVIDSON et al., 1996, Kozdrun, pers. Mitteilung).

Verschiedene Forschungsgruppen haben in ihren Arbeiten bereits seit 1963 die Empfänglichkeit der Pute für eine experimentelle intraperitoneale Infektion mit dem MKV und der Ausbildung der tumorösen Form der MK nachgewiesen (SEVOIAN et al., 1963; WITTER et al., 1970; WITTER et al., 1974; PAUL et al., 1977; ELMUBARAK et al., 1981; POWELL et al., 1984). Spontane Feldinfektionen galten aber als unwahrscheinlich, es wurde von einer natürlichen Resistenz der Puten gegen MKV ausgegangen (NAZERIAN und SHARMA, 1984).

In dieser Arbeit wurde das Auftreten tumoröser Veränderungen bei Mastputen aus 5 verschiedenen Beständen untersucht. Eine Tumorgenese durch Einwirkung nichtviraler Noxen oder spontane Einzeltierkrankungen waren aufgrund des frühen Krankheitsbeginns (5.-12. Lebenswoche), der Ausbreitung in den Herden und dem Erkranken von Tieren, die nur kurzfristig in Betrieb A gehalten wurden, auszuschließen. Es wurde deshalb von einem infektiösen Geschehen ausgegangen, als tumorinduzierender Infektionserreger kam neben den bereits erwähnten Viren REV, LPDV und MKV auch ein eventuell noch unbekanntes Virus in Betracht.

Die Erkenntnisse aus Anamnesen und klinischen Untersuchungen und die Ergebnisse der pathologisch-anatomischen, pathohistologischen, virologischen und serologischen Untersuchungen geben ein genaueres Bild der von uns untersuchten Erkrankung, die

sich sowohl in Allgemeinsymptomen wie Wachstumsretention, Apathie, Blässe, Durchfall und Schwäche bis zum Festliegen, als auch in Tumoren manifestierte.

Die Befunde werden mit den aus der Literatur gewonnenen Erkenntnissen über das Krankheitsbild der MK bei Puten verglichen. Die Rolle der PCR als eine Untersuchungsmethode zur Bestimmung des ätiologischen Agens eines tumorösen Krankheitsgeschehens in Putenherden wird diskutiert.

### **5.1 Identifizierung des Erregers der tumorösen Veränderungen**

Die ätiologische Diagnose einer tumorösen Erkrankung bei Puten ist anhand der klinischen, pathologisch-anatomischen und pathohistologischen Ergebnisse nicht möglich. So wird bei der Gegenüberstellung der aus der Literatur erhaltenen Erkenntnisse über die LPD, RE und MK deutlich, daß die klinischen Symptome, das Aussehen und die Organverteilung der Tumore, sowie das histologische Bild der Läsionen sich ähneln. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen bei den Mastputen fügen sich entsprechend ein.

Die virologische Untersuchung bietet die Möglichkeit der Isolierung von REV, MKV und eines eventuell vorkommenden unbekanntem Virus. Es konnten 44 Herpesviren isoliert werden, welche anhand ihrer Plaquemorphologie als PHV identifiziert wurden. Bei zwei der Isolate wurde diese Einstufung mittels Immunfluoreszenz bestätigt. Puten-Herpesvirus kommt bei Puten häufig vor (KAWAMURA et al., 1969; WITTER et al., 1970; DAVIDSON, pers. Mitt.; ZANDE et al., 1997). Die bisher aus Puten isolierten Herpesviren konnten in keinen kausalen Zusammenhang mit Erkrankungen oder Leistungseinbußen gebracht werden (WITTER und SCHAT, 2003). Die aus Puten gewonnenen Puten-Herpesviren (Meleagrid Herpesvirus 1) dienen seit 1970 als Lebendimpfstoffe gegen die Mareksche Krankheit des Huhnes (OKAZAKI et al., 1970; WITTER und SCHAT, 2003). Es konnte kein weiteres Virus isoliert werden. Die serologischen Untersuchungen bestätigten das Vorliegen einer PHV-Infektion bei einem Teil der Tiere.

Das Fehlen von Antikörper gegen REV und MKV läßt nicht den Schluß zu, daß diese Viren nicht die ätiologische Ursache der Tumore sein können. Bei einer toleranten

Infektion mit REV ist eine Virämie ohne Antikörperbildung möglich (PAUL et al., 1977a; McDOUGALL et al., 1980). Der AGPT hat sich zum Nachweis von Antikörper bei im Tierversuch mit MKV infizierten Puten als ungeeignet erwiesen (WITTER et al., 1970; PAUL et al., 1977b).

Lymphoide Tumore können bei Hühnern auch durch das Lymphoide Leukose Virus (LLV), Subgruppe A, welches zur Gruppe der ALSV gehört, verursacht werden (PAYNE und FADLY, 1997). In der Literatur finden sich keine Hinweise auf durch natürliche oder experimentelle Infektionen mit LLV, Subgruppe A, verursachte lymphoide Tumore bei Puten. Mit einem ELISA durchgeführte Untersuchungen auf das Vorliegen von Antikörpern gegen LLV, Subgruppe A in Serumproben aus den Betrieben A-E waren negativ. Kloakentupferproben aus Betrieb A, lieferten ebenfalls keinen Hinweis auf das eventuelle Vorliegen einer Infektion mit LLV, Subgruppe A.

DAVIDSON et al. (1996) beschreiben die PCR als sehr gute Möglichkeit, um die ätiologische Diagnose einer tumorösen Erkrankung bei Puten zu stellen. Sie fanden bei einer Reihenuntersuchung von 28 Putenherden mit Tumoren sowohl Einzelinfektionen mit MKV (17/28) und REV (6/28), als auch Mischinfektionen mit MKV und REV (3/28), MKV und LPDV (1/28), sowie MKV, REV und LPDV (1/28).

Der Nachweis von MKV-DNA in Gewebe- und Blutproben von 12 Puten aus den 5 Betrieben, sowie das negative Ergebnis der PCR zum Nachweis von REV- und LPDV-DNA in diesen Proben, beweist sicher das Vorliegen einer Infektion mit MKV. Zusammen mit dem klinischen Bild, den pathologisch-anatomischen und pathohistologischen Befunden, welche den aus der Literatur gewonnenen Erkenntnissen über das Krankheitsbild bei experimentellen und natürlichen Infektionen von Puten mit MKV entsprechen, läßt dies die ätiologische Diagnose Mareksche Krankheit bei Mastputen zu.

## **5.2 Anwendung der PCR zum Nachweis der DNA des REV, LPDV und MKV aus Tumorgewebe und Buffy-Coat-Zellen von Puten**

DAVIDSON et al. (1996) verwenden die PCR als schnelle und genaue Methode, um virale Tumore bei Hühnern und Puten zu diagnostizieren. Für die verschiedenen aviären Tumoviren wurden von ihnen und anderen Forschungsgruppen PCR-Verfahren etabliert (SILVA, 1992; ZHU et al., 1992; ALY et al., 1993, SARID et al., 1994b, DAVIDSON et al., 1996). Die Erkenntnisse aus diesen Arbeiten sind Grundlage für die in unserer Studie angewendeten PCRs.

Nach der Etablierung der PCR-Technik und dem Nachweis der Positivkontrollen in der Agarose-Gel-Elektrophorese wurden Gewebe- und Blutproben aus den verschiedenen Betrieben auf das Vorliegen viraler DNA untersucht. Dabei konnte nur MKV-DNA nachgewiesen werden, die PCR-Untersuchungen hinsichtlich des Vorliegens von REV- und LPDV-Provirus-DNA blieben negativ. Von den ersten in unserem Institut untersuchten Puten des Betriebs A standen nur formalinfixierte Proben zur Verfügung. Entgegen der Angaben in der Fachliteratur (NEWTON und GRAHAM, 1994) ist es uns nur in nichtfixiertem Organewebe möglich gewesen MKV-DNA nachzuweisen. Wenn die selben Organproben in formalinfixiertem Zustand aufgearbeitet wurden, kam es immer zu einem negativen PCR-Ergebnis. Der Frage der Ursache wurde nicht weiter nachgegangen und zur Untersuchung nur frisches Organmaterial herangezogen.

Da der Schwerpunkt der Arbeit auf der Klärung der Ätiologie des beschriebenen Krankheitsbildes lag, wurde von eigenen Untersuchungen zur Bestimmung der Sensitivität der Polymerase-Ketten-Reaktionen zum Nachweis der DNA von REV, LPDV und MKV abgesehen. Generell ist die PCR eine sehr sensitive Methode, ZHU et al. (1992) konnten bis zu 0,02 pg MKV-DNA nachweisen.

### **5.2.1 Vorsichtsmaßnahmen zur Vermeidung falsch-positiver bzw. falsch-negativer Ergebnisse der PCR**

Die hohe Sensitivität der PCR und die Möglichkeit von Kreuzkontamination gelten als Hauptursache für falsch-positive PCR-Ergebnisse (WILSON, 1997). Um diese zu vermeiden, wurden verschiedene Vorsichtsmaßnahmen angewendet, wie sie auch von KWOK und HIGUCHI (1989) aufgeführt werden. Es wurden verschiedene Arbeitsplätze für die Präparation der DNA, dem Ansetzen des PCR-Reaktionsgemisches, der Aliquotierung der Reagenzien und die Elektrophorese der Amplifikate eingerichtet. Für jeden Arbeitsplatz standen die Arbeitsgeräte wie Gefäße und Pipettierhilfen separat zur Verfügung. An den Arbeitsplätzen für die Präparation der DNA und dem Ansatz des Reaktionsgemisches war der Einsatz von UV-Licht zur Zerstörung der DNA auf Oberflächen und Geräten üblich. Das Tragen von separater Schutzkleidung am jeweiligen Arbeitsplatz und das Wechseln der Einmalhandschuhe nach jedem Arbeitsgang gehörte ebenso zum Standard, wie das Autoklavieren (121°C für 15 Minuten) der Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße und Reagenzien um eventuell an ihnen befindliche DNA zu zerstören.

Nach der Herstellung des Master-Mix und seiner Aufteilung in die Probengefäße wurden die PCR-Reagenzien weggeräumt bevor DNA zugefügt wurde. Um eine Kontamination während der Zuführung der DNA zu entdecken, wurden die Negativkontrollen zuletzt angesetzt.

Falsch-negative Ergebnisse können durch Hemmstoffe der PCR verursacht werden (NEWTON und GRAHAM, 1997; WILSON, 1997). In der hier angewendeten Präparation der DNA fanden Substanzen, deren negativer Einfluß auf die PCR bekannt ist, Anwendung. Dazu gehören z.B. das ionische Detergenz SDS und das Enzym Proteinase K. Um diese zu entfernen, wurde eine Phenol- und Phenol/Chloroform-extraktion mit anschließender Ethanol-fällung durchgeführt. Die Ethanol-fällung ist nötig, um ebenfalls auf die PCR hemmend wirkende Phenolreste zu entfernen. Weiterhin wirkt Heparin stark hemmend auf die PCR, so daß als Antikoagulanzen zur Gewinnung von Blutproben, die einer PCR-Untersuchung zugeführt werden sollten, EDTA Anwendung fand.

Um eine Beurteilung der Ergebnisse bezüglich der Spezifität der PCR und der Kontaminationsfreiheit zu ermöglichen, wurden in jedem Reaktionsansatz eine Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt (KWOK und HIGUCHI, 1989; NEWTON und GRAHAM, 1997).

Da die Positivkontrollen stets positiv und die Negativkontrollen stets negativ waren, kann davon ausgegangen werden, daß die hier aufgeführten Vorsichtsmaßnahmen sichere und eindeutige PCR-Ergebnisse zulassen.

### **5.3 Vergleich der erhobenen Daten und der Ergebnisse der klinischen, pathologisch-anatomischen, pathohistologischen, virologischen und serologischen Untersuchungen mit den aus der Literatur gewonnenen Erkenntnissen über die MK bei Puten**

Die in dieser Studie erhobenen Daten sind teilweise von den Angaben aus den Herkunftsbetrieben der erkrankten Puten abhängig. Bei den Betrieben B und E wurden genaue Aufzeichnungen über die gesamte Mastperiode geführt, bei den Betrieben A, C und D waren keine oder nur ungenaue Informationen über Tierzahlen, Krankheitsverlauf und Mortalitätsraten zu erhalten. Aus diesem Grund sind die Daten aus der Anamnese nur eingeschränkt bewertbar.

Es gibt nur wenige experimentelle Studien über die Empfänglichkeit von Puten für das MKV und die Pathogenese der MK bei Puten. Dadurch, daß diese Arbeiten sich in ihrem experimentellen Design oft sehr unterscheiden, ist die Vergleichbarkeit der erhobenen Daten nicht immer gegeben. So wurden z.B. verschiedene Putenlinien verwendet, die Versuchstiere stammten teilweise aus PHV infizierten Elternbetrieben, es wurde mit unterschiedlichen Antigenen und Antigenmengen gearbeitet und auch die Untersuchungsmethoden waren unterschiedlich. Mitentscheidend für die Morbiditäts- bzw. Mortalitätsrate in den Versuchen dürfte auch die gewählte Versuchsdauer sein.

### 5.3.1 Anamnese und klinisches Bild

Bei den von COUDERT et al. (1995) und DAVIDSON et al. (1996) beschriebenen MK-Feldinfektionen erkrankten Puten ab der 8. bzw. 12. Lebenswoche, es kam bis zur 21. bzw. 30. Lebenswoche zu Tierverlusten. In dieser Studie wurden in Betrieb B erste Krankheits Symptome ab der 8. Lebenswoche beobachtet, erste Tierverluste traten hier - ebenso wie in Betrieb D - in der 12. Lebenswoche auf. Das Auftreten der ersten Krankheitssymptome wurde in Betrieb A im ersten der betroffenen Durchgänge in der 7. Lebenswoche beobachtet, in den späteren Durchgängen wurden kranke Tiere bereits ab der 5. Lebenswoche bemerkt. In Betrieb C erkrankten Puten ab der 10. Lebenswoche. In allen Betrieben starben Puten während der gesamten Haltungsperiode von durchschnittlich 5-6 Monaten. Bei Hühnern kann das früheste Auftreten der MK in seltenen Fällen bereits in der 3.-4 Lebenswoche, eher jedoch ab der 8.-9. Lebenswoche beobachtet werden (CALNEK und WITTER, 1997).

Die Mortalität in Putenherden mit spontaner MK variiert stark. In Frankreich wurden sehr hohe Verlustraten von 80-100% beobachtet, während in Israel Verluste von 10-42% beschrieben wurden (COUDERT et al., 1995; DAVIDSON et al., 1996; MALKINSON et al., 1996). Bei Hühnern mit akuter MK kann die Mortalität bis zu 70% betragen (POWELL und PAYNE, 1993). Auch bei den experimentellen Infektionen von Puten mit MKV konnten unterschiedlich hohe Tierverluste von 14-70% beobachtet werden. Die Mortalität in Betrieb A wurde auf 10-50% geschätzt. In den Betrieben B und E wurden Mortalitätsraten von 45% und 58,2% ermittelt. Es handelt sich dabei um Angaben der Gesamtverluste. Diese sind nicht nachweislich nur durch das tumoröse Geschehen verursacht, da nicht jedes verendete Tier der pathologisch-anatomischen Untersuchung zugeführt wurde.

Auf den Betrieben A, D und E wurden neben Puten auch Hühner und andere Geflügelarten gehalten. Bei den Junghennen auf Betrieb A soll nach Auskunft des Landwirts gelegentlich ein Erscheinungsbild wie das der MK aufgetreten sein. Auf Betrieb E gehaltene Hühner zeigten Krankheitssymptome und pathologisch-anatomische Veränderungen wie sie für die MK des Huhnes typisch sind. Ob die Puten von Herkunft B und C zu irgendeinem Zeitpunkt Kontakt mit Hühnern hatten, konnte

nicht nachvollzogen werden. Es läßt sich daher nur vermuten, daß Hühner in der Übertragung der MKV auf Puten eine wichtige Rolle spielen. Diese Idee wird dadurch gestützt, daß die in Frankreich an der MK erkrankten Puten in der Nähe von Broilerbetrieben gehalten wurden, in denen zuvor eine deutliche Zunahme der MK beobachtet wurde (COUDERT et al., 1995). Auch DAVIDSON et al. (1996) finden die Nähe der an MK erkrankten Putenherden zu Broilerbetrieben bemerkenswert. In den experimentellen Studien zur MK bei Puten finden sich nur Untersuchungen über Kontaktinfektionen zwischen mit MKV infizierten Puten und gesunden Puten und Hühnern, nicht aber zwischen MKV-infizierten Hühnern und nichtinfizierten Puten. Es zeigte sich, daß in den Versuchen eine Ansteckung von Kontaktputen nur durch TK 809 und dem Feldvirus aus Frankreich erfolgte. Diese Tiere schieden demnach infektiöses MKV aus. Dagegen konnten bei den Kontakttieren von mit JM, GA, RPL 38 und FC 127 infizierten Puten keine Anzeichen für eine Übertragung gefunden werden (WITTER et al., 1970; WITTER et al., 1974; COUDERT et al., 1995).

Verschiedene Putenlinien scheinen eine unterschiedliche Empfänglichkeit bezüglich der experimentellen Infektion mit MKV zu haben. Bei Puten der Linie Beltsville konnte im Gegensatz zu Puten der Linie Nicholas durch eine Infektion mit dem MKV-Stamm GA keine MK ausgelöst werden (NAZERIAN und SHARMA, 1984). In einem anderen Versuch entwickelten Beltsville-Puten nach intraabdominaler Applikation des MKV-Stammes JM Lymphome in der Leber (WITTER et al., 1970). Durch die nur geringe Anzahl der Studien mit Puten ist hinsichtlich dieser Fragestellung keine sichere Aussage möglich. COUDERT et al. (1995) fanden die ersten MK-Ausbrüche bei Bronzeputen und gingen von einer geringeren Empfänglichkeit der weißen BUT-Hybridputen aus. Im weiteren Verlauf der Feldausbrüche waren aber auch diese betroffen. In Betrieb A wurden außer weißen Mastputen der Linie BUT Big 6 auch Bronzeputen gehalten. Der Betriebsinhaber berichtete, daß zuerst nur die weißen Puten betroffen waren und erst später auch Bronzeputen erkrankten. Die Verluste bei den Bronzeputen blieben seiner Aussage nach deutlich geringer. Die Puten der anderen Betriebe waren allesamt weiße Masthybriden, teilweise sicher der Linie BUT Big 6.

Nur wenig Informationen sind zum klinischen Bild der MK bei Puten erhältlich. So finden sich in den Veröffentlichungen zu den experimentellen Infektionen von Puten mit MKV keine Angaben zu den klinischen Erscheinungsformen der Krankheit. In den Berichten über die Feldinfektionen in Frankreich und Israel wurden die betroffenen Puten als apathisch, abgemagert und dehydriert, gelegentlich lahm oder gelähmt beschrieben. Viele der Tiere hatten Durchfall (COUDERT et al., 1995; MALKINSON et al., 1996). Ebensolche Krankheitssymptome fanden sich bei den in dieser Studie untersuchten Puten. Zusätzlich fanden sich Tiere mit ausgeprägten Hauttumoren, so daß ähnlich wie bei Hühnern eine „Hautform“ der MK beschrieben werden konnte. Auch bei Hühnern können bei der akuten Form der MK unspezifische Symptome wie Abmagerung, Anämie, reduzierte Futteraufnahme und Durchfall beobachtet werden (CALNEK und WITTER, 1997).

### **5.3.2 Pathologisch-anatomische und pathohistologische Befunde**

Die in dieser Studie aufgeführten pathologisch-anatomischen Befunde decken sich weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen Veränderungen bei Puten mit MK. Es wurden sowohl solide Tumore unterschiedlicher Größe als auch diffuse Infiltrationen der Organparenchyme gefunden, teilweise waren die Organe stark vergrößert. Übereinstimmend waren am häufigsten Leber, Milz und auch Nieren, gelegentlich Nerven, Drüsenmagen und Haut betroffen. Die in den Veröffentlichungen häufig beschriebenen Veränderungen an Herz, Gonaden und Lungen konnten nur selten oder gar nicht beobachtet werden. Darüber hinaus konnten in dieser Studie Veränderungen an Schilddrüsen, Thymus, Serosen, Muskulatur, Knochenmark, Nebennieren und Zäkaltonsillen beschrieben werden. Die Nervenveränderungen wurden von den Autoren als Schwellung mit Verlust der Querstreifung angegeben (SEVOIAN et al., 1963; WITTER et al., 1970; WITTER et al., 1974; PAUL et al., 1977; ELMUBARAK et al., 1981; POWELL et al., 1984; COUDERT et al., 1995; MALKINSON et al., 1996, PENNYCOTT und VENUGOPAL, 2002). In unserer Studie konnten zusätzlich auch knotige Veränderungen an den Nerven festgestellt werden, wie sie von PAYNE (1985) auch bei Hühnern beschrieben werden. Im Unterschied zur Organverteilung der Lymphome bei der akuten Form der MK bei Hühnern, konnten bei den von uns

untersuchten Puten keine Lymphome in den Gonaden und Lungen, und seltener Zubildungen im Drüsenmagen, Pankreas und Nebenniere gefunden werden. Das makroskopische Bild der Veränderungen bei den von uns untersuchten Puten entspricht dem bei Hühnern mit akuter MK (BEYER et al., 1980; KALETA, 1981; CALNEK und WITTER, 1997).

Die in dieser Studie beschriebenen pathohistologischen Veränderungen decken sich weitestgehend mit den in der Literatur beschriebenen histologischen Bildern veränderter Organe von an MK erkrankten Puten und Hühnern. Bereits WITTER et al. (1970) fanden in den histologischen Untersuchungen tumorös veränderter Organe MKV-infizierter Puten ein pleomorphes, mononukleäres Zellbild. Diese fokalen oder diffusen Infiltrationen des Organparenchyms enthielten Lymphozyten unterschiedlicher Größe, Lymphoblasten, Retikulumzellen und Makrophagen (WITTER et al., 1974; PAUL et al., 1977; POWELL et al., 1984). Auch wurden pyknotische Kerne und eine hohe Mitoserate gesehen (ELMUBARAK et al., 1981). Degenerative, teilweise entzündliche Veränderungen, wie sie sich im Thymus MKV-infizierter Puten fanden (ELMUBARAK et al., 1981; POWELL et al., 1984), konnten in dieser Form bei unseren Untersuchungen nicht gesehen werden. Dies kann u.U. an der geringen Anzahl der histologisch untersuchten Thymusproben (n=3) liegen. Die von uns beschriebene Atrophie der Bursa Fabricii entsprach dem von diesen Autoren beobachteten degenerativen Charakter der Veränderung des lymphatischen Organs. Das histologische Bild der betroffenen Nerven ist nach ELMUBARAK et al. (1981) identisch mit den bei Hühnern gefundenen Veränderungen. COUDERT et al. (1995) beschreiben multifokale Infiltrationen der betroffenen Nerven mit polymorphen lymphoiden Zellen. Nach der für Hühner erarbeiteten Einteilung der Nervenveränderungen (PAYNE und BIGGS, 1967; PAYNE, 1972; PAYNE, 1985), könnte eine Einstufung der in unserer Studie gefundenen Nervenläsionen in hauptsächlich Typ-C-Läsionen erfolgen. Lediglich bei dem Nervenpräparat mit den deutlich stärkeren Veränderungen könnte es sich um eine Typ-B-Läsion handeln. Lymphoide Infiltrationen der Schilddrüsen, wie sie hier beschrieben wurden, sind in der Literatur ebensowenig zu finden, wie die von uns beobachteten Veränderungen an Thymus und Knochenmark.

### 5.3.3 Virologische und serologische Untersuchungen

Die Reisolierung von MKV aus Blut und Gewebe experimentell infizierter Puten ist schwierig bzw. gelingt nur bei einem geringen Teil der Proben (WITTER et al., 1970; WITTER et al., 1974; POWELL et al., 1984). Die Titer der nachweisbaren zirkulierenden MKV sind bei Puten deutlich niedriger als bei Hühnern (ELMUBARAK et al., 1981). COUDERT et al. (1995) konnten bei den Feldausbrüchen in Frankreich in verschiedenen Zell- bzw. Eikulturen kein MKV isolieren. Erst GAUDRY (1997) berichtet im Zusammenhang mit den Ausbrüchen in Frankreich von der erfolgreichen Isolierung eines MKV durch Beimpfung von EEF mit Blutproben. In dieser Studie gelang es uns nicht, MKV aus Probenmaterial von erkrankten Puten zu isolieren. Die anfangs verwendete Methodik, bei welcher die Gewebeproben mit Ultraschall behandelt und Probenüberstand auf HEF beimpft wurde, eignete sich nicht zur Isolierung eines zellgebundenen Virus wie des MKV. Aber auch die Verwendung von HENZ und EEF, sowie eine modifizierte Probenaufarbeitung mit dem Ziel vitale Zellen zu inokulieren erbrachte nicht den gewünschten Erfolg.

Nur wenig ist bekannt über die Antikörperbildung von Puten nach einer Infektion mit MKV. Der Nachweis von Antikörpern gegen MKV in den Seren der experimentell mit den MKV-Stämmen JM, FC 127 und GA infizierten Puten mit dem AGPT gelang nicht (WITTER et al. 1970; PAUL et al. 1977). Auch in den von uns gewonnenen Seren erkrankter Puten konnten im AGPT keine Antikörper gegen MKV nachgewiesen werden. In einem anderen Versuch konnten unter Anwendung des indirekten IFT nur bei 2-9% der Seren der mit JM, GA und RPL 39 und bei 27% der mit TK 809 infizierten Puten Antikörper nachgewiesen werden (WITTER et al., 1974). Das unter mysteriösen Umständen aus Puten isolierte TK 809 zeigte im Vergleich zu den aus Hühnern isolierten MKV eine deutlich höhere Antigenität. Unklar bleibt, ob bei Puten von einer zu Hühnern unterschiedlichen Immunreaktion nach einer MKV-Infektion auszugehen ist. Hinweise, daß Puten nach einer experimentellen Infektion mit MKV eine andere immunologische Reaktion als Hühner aufweisen, sind das Fehlen der frühen lytischen Infektion des lymphatischen Gewebes in Bursa Fabricii und die nur milden Läsionen in Thymus und Milz (ELMUBARAK et al., 1981). Auch erkrankten deutlich

mehr bursektomierte als intakte Puten nach experimenteller Infektion mit MKV, während bei Hühnern dieser Eingriff keinerlei Einfluss auf die Ausbildung der MK hat (NAZERIAN und SHARMA, 1984). In einer früheren Arbeit hatten NAZERIAN et al. (1982) B-Lymphozyten als Targetzellen für MKV in Puten angegeben. Die Ergebnisse nach der Bursektomie und auch die Studie von POWELL et al. (1984) sprechen aber für die Infektion von T-Lymphozyten - wie sie auch bei Hühnern erfolgt - durch das MKV bei Puten.

#### **5.4 Möglichkeiten der Vakzinierung von Puten gegen die MK**

COUDERT et al. (1995) zeigten, daß die Impfung von Puteneintagsküken mit dem MKV-Impfstamm CVI 988 von den Tieren gut vertragen wurde und diese erfolgreich vor der MK geschützt waren. Da in Südwestfrankreich bei ca. 18% der Putenhaltungen MK auftrat, wurden 1996 ca. 500.000 Puten in dieser Region geimpft (GAUDRY, 1997). Dieser Impferfolg konnte bei den in Betrieb A eingestellten, mit CVI 988 geimpften Puten nicht nachvollzogen werden. Bei 20% (4/21) der geimpften Puten konnte die MK nachgewiesen werden. Dies waren 20% weniger als bei den 18 ungeimpften Tieren (7/18 MK positiv), aber aufgrund der geringen Tierzahl ist dieses Ergebnis vorsichtig zu bewerten. DAVIDSON et al. (2002a) konnten bei dem von ihnen durchgeführten Vakzinationsversuch mit CVI 988 keinerlei protektiven Effekt der Impfung feststellen. 71% der nichtvakzinierten und 83% der vakzinierten Puten starben nach der Kontrollinfektion mit dem Puten-MKV-Stamm La. Die Belastungsinfektion erfolgte hierbei aber experimentell durch eine intraperitoneale Injektion, was u.U. zu dem Impfversagen beigetragen hat.

Um eine weitere Haltung von Puten in Betrieb A zu ermöglichen, wurden 1997 Puten erst im Alter von 5-6 Wochen eingestallt. Die Tiere der ersten zwei von insgesamt vier Durchgängen, wurden zweimal kombiniert mit Puten-Herpesvirus- und Rispen-Vakzine geimpft (1. und 14. Lebenstag). Während der ersten Lebenswochen wurden die Tiere in einer hühnerfreien Umgebung aufgezogen. Lediglich ein Tier des letzten Durchganges erkrankte und entwickelte tumoröse Veränderungen. Seither werden auf Betrieb A ungeimpfte Puten ab der 5. Lebenswoche eingestallt, es konnte kein erneutes

Auftreten der MK beobachtet werden. Dies läßt die Vermutung zu, daß bei Puten eine Art Altersresistenz vorzukommen scheint. Bei Hühnern wird eine Altersresistenz beschrieben, welche vermutlich mit der zellulären Immunabwehr zusammenhängt (WITTER, 1976). Mit zunehmendem Alter zum Zeitpunkt der Infektion mit MKV kommt es zur Regression der neoplastischen Läsionen (SHARMA et al., 1973).

### 5.5 Überlegungen zur Frage warum die MK bei Puten auftritt

Der Anstieg in der Zahl der MK-Fälle bei Puten in den letzten Jahren geht parallel einher mit der Entdeckung neuer, hochvirulenter MKV-Stämme - sogenannter sehr hoch onkogene + Stämme - in den letzten Jahren (WITTER, 1997b). Dies könnte Ursache für eine Überwindung der natürlichen Resistenz der Pute sein. Auch in Deutschland konnten Mitte der 90er Jahre stark zytolytische MKV-Stämme isoliert werden (KROSS et al., 1998).

Eine andere Hypothese geht von einer höheren Empfänglichkeit der modernen Hybridputen aus. Wie bereits beschrieben, tritt die MK nach experimenteller Infektion genetisch unterschiedlicher Puten mit dem selben MKV-Stamm unterschiedlich häufig auf (NAZERIAN und SHARMA, 1984; WITTER et al., 1970). Bisher sind nur wenige Infektionsversuche mit modernen Hybridputen bekannt (COUDERT et al., 1995, DAVIDSON et al., 2002a). Bei dem Versuch von COUDERT et al. (1995) erkrankte nur ein Teil der mit einem sehr hoch onkogenen Stamm (RB1B) infizierten Puten, während die mit einem hoch onkogenen Stamm (HPRS 16) infizierten Tiere gesund blieben. Dieses Ergebnis spricht wiederum nicht für eine höhere Empfänglichkeit der modernen Hybridpute. Die nur geringe Anzahl der Studien mit Puten läßt jedoch viele Fragen offen.

Natürlich können auch beide Faktoren für das vermehrte Auftreten der MK bei Puten verantwortlich sein. So ist für Hühner bekannt, daß neben der Virulenz des infizierenden MKV-Stammes, die genetische Konstitution eines Tieres die Vermehrung von MKV im Organismus mitzubestimmen scheint. Hohe Virämietiter gehen beim Huhn mit einer hohen MK-Mortalität einher (BERTRAM, 1999).

Auch denkbar ist die Möglichkeit, daß es sich bei den Puten-MKV um genetisch von

den Hühner-MKV unterscheidbare Variationen handelt. Erste Untersuchungen in dieser Richtung liegen von DAVIDSON et al. (2002b) vor. Sie konnten einen Unterschied bei den Epitopen des gB von Hühner-MKV (Stamm MD 11 und RB1B) und Puten-MKV (Stamm La) feststellen. Interessant wäre in dieser Hinsicht auch eine Untersuchung der Epitope israelischer Hühner-MKV, ob diese sich ebenfalls von denen des Puten-MKV unterscheiden. Unklar bleibt jedoch, warum keinerlei Unterschied in der genetischen Sequenz des gB der drei untersuchten Viren zu finden ist.

## **5.6 Ausblick**

Bislang sind in Deutschland lediglich wenige, kleine Bestände, in denen die Puten unter nichtindustriellen Bedingungen gehalten werden, betroffen. Obwohl nicht beweisbar, liegt der Verdacht nahe, daß Hühner als Virusreservoir anzusehen sind. Eine strikte Isolierung der Putenhaltungen ist daher zu empfehlen.

Falls es in Deutschland zu einem seuchenhaften MK-Ausbruch bei Puten, wie es in Frankreich beobachtet wurde, kommen sollte, ist eine Impfung von Puteneintagsküken mit CVI 988 zu empfehlen.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Mareksche Krankheit (MK) ist eine durch ein hochkontagiöses und onkogenes Herpesvirus verursachte lymphoproliferative Krankheit, deren natürlicher Wirt das Huhn ist. Puten galten lange Zeit als krankheitsresistent gegen eine natürliche Infektion mit dem Virus der Marekschen Krankheit (MKV). Dies änderte sich durch Berichte über Feldinfektionen mit MKV bei Puten in Frankreich, Israel, Polen, Schottland und Italien, bei denen Puten die akute, tumoröse Form der MK entwickelten.

Hier wird von 5 Betrieben in Deutschland, bei welchen die Mareksche Krankheit bei Mastputen aufgetreten ist, berichtet. Erste Krankheitssymptome traten zwischen der 5. und 10. Lebenswoche auf. Es starben 10 bis 58% der Mastputen während der gesamten Haltungsperiode von 5-6 Monaten.

Das klinische Bild war häufig unspezifisch, die Tiere waren im Wachstum zurückgeblieben, blaß, apathisch, hatten Durchfall und waren teilweise lahm oder gelähmt. Es wurden bei einzelnen Tieren Hauttumoren beobachtet.

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung konnten sowohl solide Tumoren unterschiedlicher Größe als auch diffuse Infiltrationen des Parenchyms v.a. in Leber, Milz und Nieren beobachtet werden. Auch betroffen waren Magen-Darm-Trakt, Schilddrüsen, periphere Nerven, Thymus, Haut, Serosen, Muskulatur, Pankreas, Knochenmark, Nebennieren und Zäkaltonsillen.

Histologisch fanden sich fokale oder diffuse Infiltrationen des Organparenchyms mit pleomorphen, mononukleären Zellen.

Serologische Untersuchungen mittels AGPT und ELISA konnten keinen Hinweis auf das Vorliegen von Antikörpern gegen das Retikuloendotheliosevirus (REV), das lymphatische Leukosevirus (LLV) oder MKV geben.

Bei den virologischen Untersuchungen konnte nur Puten-Herpesvirus (PHV) isoliert werden, das als apathogen für Puten gilt.

Unter Verwendung der PCR gelang der Nachweis von MKV-DNA in Leber-, Milz-, Nieren-, Lungen-, Herz-, Thymus-, Pankreas und Schilddrüsen- und Blutzellen (Leukozyten und Gesamtblut) von erkrankten Puten. Die dabei verwendeten Primer

flankieren die 132-bp repeat region, eine Sequenz die für MKV Serotyp 1 spezifisch ist und bei nichtattenuierten Stämmen ein- bis dreimal vorliegt. Die Proben von den Betrieben A, B, C und E erbrachten Amplifikationsprodukte von 317 bp (2 Kopien) und die Proben von Betrieb D erbrachten Amplifikate in einer Größe von 449 bp (3 Kopien). Bei der PCR zum Nachweis von REV bzw. der lymphoproliferativen Krankheit der Puten (LPDV) erbrachte nur die DNA der Positivkontrollen Amplifikate der erwarteten Größen. In den Proben der erkrankten Puten konnten keine REV- oder LPDV - spezifischen Sequenzen nachgewiesen werden.

## 7 SUMMARY

Marek's disease (MD) is a lymphoproliferative disease caused by a highly contagious and oncogenic herpesvirus. Chickens are the natural host and for a long time turkeys seemed to be resistant to a natural infection with Marek's disease virus (MDV). This changed since MDV has been demonstrated in lymphomatous tumors found in turkeys in France, Israel, Poland, Scotland and Italy.

We are reporting about 5 farms in Germany, where fattening turkeys showed Marek's disease. First symptoms were seen at an age of 5 to 10 weeks. 10 to 58% of the turkeys died during the keeping period up to an age of 5-6 months.

The clinical signs were often unspecific, affected turkeys were retarded in growth, pale, apathic, showed diarrhoea and sometimes were unreluctant to move or paralytic. Skin tumors were seen in some birds.

Necropsied birds had solid tumors of different sizes as well as diffuse infiltration, mainly in liver, spleen and kidney. Also affected were the intestine, thyroid gland, peripheral nerves, thymus, skin, serous membrane, muscles, pancreas, bone marrow, adrenal glands and caecal tonsils.

Histological examinations showed a focal or diffuse pleomorphic cell infiltration with mainly mononuclear cells in the affected organs.

Serological examinations did not establish the presence of antibodies against reticuloendotheliosis virus (REV), lymphoid leukemia virus (LLV) or Marek's disease virus.

Virological examination yielded only herpesvirus of turkeys (HVT) which is considered apathogenic.

Using the PCR, we were able to detect MDV DNA in liver-, spleen-, kidney-, lung-, heart-, thymus-, pancreas- and thyroid gland-tissue and blood cells (buffy-coat-cells and whole blood) of affected turkeys. The chosen oligonucleotide primers are flanking the 132-bp repeat regions which are specific for MDV serotype 1. The genome of nonattenuated MDV strains contains one to three copy numbers of these repeats. The samples of farm A, B, C and E showed amplification products of 317 bp (2 copies) and

the samples of farm D showed PCR products of 449 bp size (3 copies). Only the positive control DNA gave amplification products of the expected sizes with the PCR for REV and the lymphoproliferative disease of turkeys virus (LPDV). No REV- or LPDV-specific DNA sequences were detected in the diagnostic samples.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

ALY, M. M., E. J. SMITH and A. M. FADLY (1993):

Detection of reticuloendotheliosis virus infection using the polymerase chain reaction.  
*Avian Pathology* **22**: 543-554.

ANDERSON, A. S., A. FRANCESCONI and R. W. MORGAN (1992):

Complete nucleotide sequence of the Marek's disease virus ICP4 gene.  
*Virology* **189**: 657-667.

ANDREWES, C. H. and R. E. GLOVER (1939):

A case of neurolymphomatosis in a turkey.  
*The Veterinary Record* **51**: 934-935.

BAGUST, T. J., T. M. GRIMES and N. RATNAMOHAN (1981):

Experimental infection of chickens with an australian strain of reticuloendotheliosis virus. 3.  
Persistent infection and transmission by the adult hen.  
*Avian Pathology* **10**: 375-385.

BERTRAM, E. (1999):

Virologische und immunologische Untersuchungen nach Verabreichung von mono-, bi- und trivalenten Lebendvakzinen gegen die Marek'sche Krankheit des Huhnes.  
Dissertation Vet. Med., Hannover.

BEYER, J., R. NOEL, K. VOGEL und C. PLENIO (1980):

Untersuchungen zur Sicherheit der Herdendiagnostik der Marekschen Krankheit und lymphoiden Leukose des Huhnes auf der Grundlage des pathologisch-anatomischen Befundes.

*Archiv für experimentelle Veterinärmedizin, Leipzig*, **34**: 827-836.

BEYER, J. und O. WERNER (1990):

Tumorhistogenese und Makrophagengehalt in Lymphomen bei Marekscher Krankheit des Huhnes.

Archiv für experimentelle Veterinärmedizin, Leipzig, **44**: 233-249.

BIGGS, P. M. (1964):

The avian leucosis complex.

World's Poultry Science Journal **20**: 78-91.

BIGGS, P. M. (1997a):

Lymphoproliferative disease of turkeys.

In: CALNEK, B. W. (Ed.) Diseases of Poultry, 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Iowa, pp. 485-489.

BIGGS, P. M. (1997b):

Marek's disease herpesvirus: oncogenesis and prevention.

Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **352**: 19511-1962.

BIGGS, P. M., H. G. PURCHASE, B. R. BEE and P. J. DALTON (1965):

Preliminary report on acute Marek's disease (fowl paralysis) in Great Britain.

The Veterinary Record **77**: 1339-1340.

BIGGS, P. M. and L. N. PAYNE (1967):

Studies on Marek's disease. I. Experimental transmission.

Journal of the National Cancer Institute **39**: 267-280.

BIGGS, P. M. and B. S. MILNE (1972):

Biological properties of a number of Marek's disease virus isolates.

In: BIGGS, P. M. , G. DE THÉ and L. N. PAYNE (Eds.): Oncogenesis and herpesviruses.

International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 88-94.

BIGGS, P. M., B. S. MILNE, J. A. FRAZIER and B. S. MILNE (1974):

Lymphoproliferative disease of turkeys.

Proceedings of the 15<sup>th</sup> World's Poultry Congress, World's Poultry Science Association, Washington DC, S. 55-56.

BIGGS, P. M., J. S. McDOUGALL, J. A. FRAZIER and B. S. MILNE (1978):

Lymphoproliferative disease of turkeys. 1. Clinical aspects.

*Avian Pathology* **7**: 131-139.

BRADLEY, G., M. HAYASHI, G. LANCZ, A. TANAKA and M. NONOYAMA (1989a):

Structure of the Marek's disease virus *BamHI-H* gene family: Genes of putative importance for tumor induction.

*Journal of Virology* **63**: 2534-2542.

BRADLEY, G., G. LANCZ, A. TANAKA and M. NONOYAMA (1989b):

Loss of Marek's disease virus tumorigenicity is associated with truncation of RNAs transcribed within *BamHI-H*.

*Journal of Virology* **63**: 4129-4135.

BUCKMASTER, A. E., S. D. SCOTT, M. J. SANDERSON, M. E. G. BOURSNEILL, N. L. J. ROSS and M. M. BINNS (1988):

Gene sequence and mapping data from Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys: Implications for herpesvirus classification.

*Journal of General Virology* **69**: 2033-2042.

BÜLOW, V. VON and P. M. BIGGS (1975a):

Differentiation between strains of Marek's disease virus and turkey herpesvirus by immunofluorescence assays.

*Avian Pathology* **4**: 133-146.

BÜLOW, V. VON and P. M. BIGGS (1975b):

Precipitating antigens associated with Marek's disease viruses and a herpesvirus of turkeys. *Avian Pathology* **4**: 147-162.

BURGESS, S. C., P. KAISER and T. F. DAVISON (1996):

A novel lymphoblastoid surface antigen and its role in Marek's disease (MD).

In: R. F. SILVA, H. H. CHENG, P. M. COUSSENS, L. F. LEE and L. F. VELICER (Eds.), *Current research on Marek's disease, Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Marek's disease, 7-11 September, East Lansing, Michigan. American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA, pp. 29-39.*

BUSCH, R. H. and L. E. WILLIAMS JR. (1970):

A Marek's disease-like condition in Florida turkeys. *Avian Diseases* **14**: 550-554.

CALNEK, B. W. (1998):

Lymphomagenesis in Marek's disease. *Avian Pathology* **27**: S54-S64.

CALNEK, B. W., H. K. ADLDINGER and D. E. KAHN (1970):

Feather follicle epithelium: A source of enveloped and infectious cell-free herpesvirus from Marek's disease. *Avian Diseases* **16**: 219-233.

CALNEK, B. W., K. A. SCHAT, L. J. N. ROSS and C.-L. H. CHEN (1984):

Further characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes. I. In vivo infection. *International Journal of Cancer* **33**: 389-398.

CALNEK, B. W. and R. L. WITTER (1997):

Marek's disease.

In: CALNEK, B. W. (Ed.) Diseases of Poultry, 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Iowa, pp. 369-413.

CALNEK, B. W., R. W. HARRIS, C. BUSCAGLIA, K. A. SCHAT and B. LUCIO (1998):

Relationship between the immunosuppressive potential and the pathotype of Marek's disease virus isolates.

Avian Diseases **42**: 124-132.

CARLSON, H. C., G. L. SEAWRIGHT and J. R. PETTIT (1974):

Reticuloendotheliosis in Japanese quail.

Avian Pathology **3**: 169-175.

CARROZZA, J. H., T. N. FREDRICKSON, R. P. PRINCE and R. E. LUGINBUHL (1973):

Role of desquamated epithelial cells in transmission of Marek's disease.

Avian Diseases **17**: 767-781.

CEBRIAN, J., C. KASCHKA-DIERICH, N. BERTHELOT and P. SHELDRIK (1982):

Inverted repeat nucleotide sequences in the genomes of Marek's disease virus and the herpesvirus of the turkey.

Proceedings of the National Academy of Science, USA, **79**: 555-558.

CHANG, K., S. LEE, K. OHASHI, A. IBRAHIM and M. ONUMA (2002):

The detection of the meq gene in chicken infected with Marek's disease virus serotype 1.

Journal of Veterinary Medical Science **64**: 413-417.

CHEN, J. H. and H. G. PURCHASE (1970):

Surface antigen on chick kidney cells infected with the herpesvirus of Marek's disease.

Virology **40**: 410-412.

CHEN, P.-Y., Z. CUI, L. F. LEE and R. L. WITTER (1987):

Serologic differences among nondefective reticuloendotheliosis viruses.

Archives of Virology **93**: 233-245.

CHEN, X. B., P. J. SONDERMEIJER and L. F. VELICER (1992):

Identification of a unique Marek's disease virus gene which encodes a 38-kilodalton phosphoprotein and is expressed in both lytically cells and latently infected lymphoblastoid tumour cells.

Journal of Virology **66**: 85-94.

CHUBB, R. C. and A. E. CHURCHILL (1968):

Precipitating antibodies associated with Marek's disease.

The Veterinary Record **83**: 4-7.

CHURCHILL, A. E. and P. M. BIGGS (1967):

Agent of Marek's disease in tissue culture.

Nature **215**: 528-530.

CHURCHILL, A. E., L. N. PAYNE and R. C. CHUBB (1969):

Immunization against Marek's disease using a live attenuated virus.

Nature **221**: 744-747.

COFFIN, J. M., M. ESSEX, R. GALLO, T. M. GRAF, Y. HINUMA, E. HUNTER, R.

JAENISCH, R. NUSSE, S. OROSZLAN, J. SVOBODA, N. TEICH, K. TOYOSHIMA and

H. VARMUS (1995):

Family Retroviridae.

In: MURPHY, F. A., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, S. A. GHABRIAL, A. W.

JARVIS, G. P. MARTELLI, M. A. MAYO and M. D. SUMMERS (Eds.): Virus Taxonomy.

Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses, pp. 193-204. Springer

Verlag, Wien, New York.

- COHEN, R. S., T. C. WONG and M. M. C. LAI (1981):  
Characterization of transformation- and replication-specific sequences of reticuloendotheliosis virus.  
*Virology* **113**: 672-685.
- COLWELL, W. M. and S. C. SCHMITTLE (1968):  
Studies on acute Marek's disease. VII. Airborne transmission of the GA isolate.  
*Avian Diseases* **12**: 724-729.
- COUDERT, F., A. VAUILLAUME, M. WYERS and F. X. LEGROS (1995):  
Une nouvelle pathologie chez la dinde - la maladie de Marek.  
Proc. Journées de la recherche avicole J.R.A., 28-30<sup>th</sup> March, Anger, France, pp. 164-166.
- CUI, Z., L. F. LEE, J.-L. LIU and H.-J. KUNG (1991):  
Structural analysis and transcriptional mapping of the MDV genome encoding pp38, an antigen associated with transformed cells.  
*Journal of Virology* **65**: 6509-6515.
- DAVIDSON, I., Y. WEISMAN, U. ORGAD, B. JACOBSON, S. PERL, C. STRENGER, Y. BECKER and M. MALKINSON (1988):  
Pathogenicity studies of Marek's disease virus isolates in Israel.  
*Israel Journal of Veterinary Medicine* **44**: 223-232.
- DAVIDSON, I., A. BOROVSKEYA, S. PERL and M. MALKINSON (1995a):  
Use of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with Marek's disease virus and reticuloendotheliosis virus.  
*Avian Pathology* **24**: 69-94.

DAVIDSON, I., E. J. SMITH, S. PERL and M. MALKINSON (1995b):

Application of the polymerase chain reaction for the diagnosis of natural infection of chickens and turkeys with avian oncogenic viruses.

Israel Journal of Veterinary Medicine **50**: 97-104.

DAVIDSON, I., Y. WEISMAN, S. PERL and M. MALKINSON (1996):

Differential diagnosis of avian tumors by PCR and a case of MDV-1 in turkeys.

In: R. F. SILVA, H. H. CHENG, P. M. COUSSENS, L. F. LEE and L. F. VELICER (Eds.), Current research on Marek's disease, Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Symposium on Marek's disease, 7-11 September, East Lansing, Michigan. American Association of Avian Pathologists, Pennsylvania, USA, pp. 311-316.

DAVIDSON, I. and M. MALKINSON (1997):

Epidemiology and control of reticuloendotheliosis virus in chickens and turkeys in Israel.

In: Avian Tumor Viruses Symposium-Diagnosis and Control of Neoplastic Diseases of Poultry. 40<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association of Avian Pathologists, Reno, Nevada, pp. 70-75.

DAVIDSON, I. and R. BORENSHTAIN (2002):

The feather tip of commercial chickens are a favorable source of DNA for the amplification of Marek's disease virus and avian leukosis virus, subgroup J.

Avian Pathology **31**: 237-240.

DAVIDSON, I., M. MALKINSON and Y. WEISMAN (2002a):

Marek's disease in turkeys. I. A seven-year survey of commercial flocks and experimental infection using two field isolates.

Avian Diseases **46**: 314-321.

DAVIDSON, I., M. MALKINSON and Y. WEISMAN (2002b):

Marek's disease in turkeys. II. Characterization of the viral glycoprotein B gene and antigen of a turkey strain of Marek's disease virus.

Avian Diseases **46**: 322-333.

DRÉN, C. N., E. SÁGHY, R. GLÁVITS, F. RÁTZ, J. PING and V. SZTOJKOV (1983):

Lymphoreticular tumour in pen-raised pheasants associated with a reticuloendotheliosis like virus infection.

Avian Pathology **12**: 55-71.

DRÉN, C. N., I. NÉMETH, I. SÁRI, F. RÁTZ, R. GLÁVITS and P. SOMOGYI (1988):

Isolation of a reticuloendotheliosis-like virus from naturally occurring lymphoreticular tumours of domestic goose.

Avian Pathology **17**: 259-277.

DUTTON, R. L., S. G. KENZY and W. A. BECKER (1973):

Marek's disease in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*).

Poultry Science **52**: 139-143.

EIDSON, C. S. and S. C. SCHMITTLE (1968):

Studies on acute Marek's disease: I. Characteristics of isolate GA in chickens.

Avian Diseases **12**: 467-476.

EIDSON, C. S., M. N. ELLIS and S. H. KLEVEN (1981):

Reduced vaccinal protection of turkey herpesvirus against field strains of Marek's disease herpesvirus.

Poultry Science **60**: 317-322.

ELMUBARAK, A. K., J. M. SHARMA, R. L. WITTER, K. NAZERIAN and V. L. SANGER (1981):

Induction of lymphomas and tumor antigen by Marek's disease virus in turkeys.  
*Avian Diseases* **25**: 911-926.

ELMUBARAK, A. K., A. K., J. M. SHARMA, R. L. WITTER, and V. L. SANGER (1982):

Marek's disease in turkeys: Lack of protection by vaccination.  
*American Journal of Veterinary Research* **43**: 740-742.

FADLY, A. M. and R. L. WITTER (1998):

Oncornaviruses: leucosis/sarcomas and reticuloendotheliosis.

In: SWAYNE, D. E., GLISSON, J. R., JACKWOOD, M. W., PEARSON, J. E. and W. M. REED (Eds): *A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogenes*, 4<sup>th</sup> edition, pp. 185-196.

FRITZSCHE, K. (1933):

Merkblatt über die normalen Augenfarben des Huhnes sowie über die Augenveränderungen bei Marek'scher Hühnerlähmung.

Geflügelgesundheitsdienst des Reichsnährstandes, 1-5.

FUKUCHI, K., M. SUDO, Y.-S. LEE, A. TANAKA and M. NONOYAMA (1984):

Structur of Marek's disease virus DNA: Detailed restriction enzyme map.

*Journal of Virology* **51**: 102-109.

GAK, E., A. YANIV, A. CHAJUT, M. IANCONESCU, S. R. TRONICK and A. GAZIT (1989):

Molecular cloning of an oncogenic replication-competent virus that causes lymphoproliferative disease in turkeys.

*Journal of Virology* **63**: 2877-2880.

GAK, E., A. YANIV, L. SHERMAN, M. IANCONESCU, S. R. TRONICK and A. GAZIT (1991):

Lymphoproliferative disease virus of turkeys: Sequence analysis and transcriptional activity of the long terminal repeat.

Gene **99**: 157-162.

GAUDRY, D. (1997):

France - Marek's disease in turkeys.

Aerosols **9**: 9.

GAZIT, A., A. YANIV, M. IANCONESCU, K. PERK, B. AIZENBERG and A. ZIMBER (1979):

Molecular evidence for a type C retrovirus etiology of the lymphoproliferative disease of turkeys.

Journal of Virology **31**: 639-644.

GAZIT, A., Z. SCHWARZBARD, A. YANIV, M. IANCONESCU, K. PERK and A. ZIMBER (1982):

Organotropism of the lymphoproliferative disease virus (LPDV) of turkeys.

International Journal of Cancer **29**: 599-604.

GAZIT, A., A. YANIV, A. ILANI, M. IANCONESCU, K. PERK and A. ZIMBER (1983):

Genetic control of the organ specificity of lymphoproliferative disease virus (LPDV) of turkeys.

International Journal of Cancer **31**: 351-356.

GIMENO, I. M., R. L. WITTER and W. M. REED (1999):

Four distinct neurologic syndromes in Marek's disease: Effect of viral strain and pathotype.

Avian Diseases **43**: 721-737.

GROSS, W. B. (1972):

Effect of social stress on occurrence of Marek's disease in chickens.

American Journal of Veterinary Research **33**: 2275-2279.

HALLIWELL, W. H. (1971):

Lesions of Marek's disease in a great horned owl.

Avian Diseases **15**: 49-55.

HIRAI, K., K. IKUTA and S. KATO (1979):

Comparative studies on Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys DNAs.

Journal of General Virology **45**: 119-131.

HIRAI, K., K. IKUTA and S. KATO (1981):

Structural changes of the DNA of Marek's disease virus during serial passage in cultured cells.

Virology **115**: 385-389.

HIRAI, K., H. HONMA, K. IKUTA and S. KATO (1984):

Genetic relatedness of virulent and avirulent strains of Marek's disease virus.

Archives of Virology **79**: 293-298.

HIRAI, K., K. NAKAJIMA, K. IKUTA, R. KIRISAWA, Y. KAWAKAMI, T. MIKAMI and S. KATO (1986):

Similarities and dissimilarities in the structure and expression of viral genomes of various strains immunologically related to Marek's disease virus.

Archives of Virology **89**: 113-130.

HOELZER, J. D., R. B. FRANKLIN and H. R. BOSE, jr. (1979):

Transformation by reticuloendotheliosis virus: development of a focus assay and isolation of a nontransforming virus.

Virology **93**: 20-30.

HOELZER, J. D., R. B. LEWIS, C. R. WASMUTH and H. R. BOSE, jr. (1980):

Hematopoietic cell transformation by reticuloendotheliosis virus: characterization of the genetic defect.

Virology **100**: 462-474.

HOOFT VAN IDDEKINGE, B. J. L., L. STENZLER, K. A. SCHAT, H. BOERRIGTER and G. KOCH (1999):

Genome analysis of Marek's disease virus strain CVI-988: effect of cell culture passage on the inverted repeat regions.

Avian Diseases **43**: 182-188.

HUNTER, E., J. CASEY, B. HAHN, M. HAYAMI, B. KORBER, R. KURTH, J. NEIL, A. RETHWILM, P. SONIGO and J. STOYE (2000):

Virus Taxonomy. 7<sup>th</sup> Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses.

In: VAN REGENMORTEL, M. H. V., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, E. B. CARSTENS, M. K. ESTENS, S. M. LEMON, J. MANILOFF, M. A. MAYO, D. J. McGEOCH, C. R. PRINGLE and R. B. WICHNER (Eds.), Academic Press, San Diego, California, pp. 369-387.

IANCONESCU, M. (1977):

Reticuloendotheliosis antigen for the agar gel precipitation test.

Avian Pathology **6**: 259-267.

IANCONESCU, M., K. PERK, A. ZIMBER and YANIV, A. (1979):

Reticuloendotheliosis and lymphoproliferative disease of turkeys. Pathology and differential diagnosis.

Refuah Veterinarith **36**: 1-12.

IANCONESCU, M., A. GAZIT, A. YANIV, K. PERK and A. ZIMBER (1981):

Comperative susceptibility of two turkey strains to lymphoproliferative disease virus.

Avian Pathology **10**: 131-136.

IANCONESCU, M., A. YANIV, A. GAZIT, K. PERK and A. ZIMBER (1983):

Susceptibility of domestic birds to lymphoproliferative disease virus (LPDV) of turkeys.

Avian Pathology **12**: 291-302.

IGARASHI, T., M. TAKAHASHI, J. DONOVAN, J. JESSIP, M. SMITH, K. HIRAI, A. TANAKA and M. NONOYAMA (1987):

Restriction enzyme map of herpesvirus of turkey DNA and its collinear relationship with Marek's disease virus DNA.

Virology **157**: 351-358.

IKUTA, K., S. UEDA, S. KATO and K. HIRAI (1983):

Monoclonal antibodies reactive with the surface and secreted glycoproteins of Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys.

Journal of General Virology **64**: 2597-2610.

IKUTA, K., K. NAKAJIMA, S. UEDA, S. KATO and K. HIRAI (1984):

Studies on the serological cross-reaction between Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys using monoclonal antibodies to major virus-specific polypeptides.

Archives of Virology **81**: 337-343.

ISFORT, R. J., R. A. STRINGER, H.-J. KUNG and L. F. VELICER (1986a):

Synthesis, processing, and secretion of the Marek's disease herpesvirus A antigen glycoprotein.

Journal of Virology **57**: 464-474.

ISFORT, R. J., I. SITHOLE, H. J. KUNG and L. F. VELICER (1986b):

Molecular characterization of Marek's disease herpesvirus B antigen.

Journal of Virology **59**: 411-419.

JONES, D., L. LEE, J.-L. LIU, H.-J. KUNG and J. K. TILLOTSON (1992):

Marek disease virus encodes a basic-leucine zipper gene resembling the fos/jun oncogenes that is highly expressed in lymphoblastoid tumors.

Proceedings of the National Academy of Science, USA, **89**: 4042-4046.

JUNGHERR, E. (1939):

Neurolymphomatosis phasianorum.

Journal of the American Veterinary Medical Association **94**: 49-52.

JUNGHERR, E. (1941):

Tentative pathologic nomenclature.

American Journal of Veterinary Research **2**: 116.

KALETA, E. F. (1975):

Vermehrung, Interferenz und Interferonproduktion aviärer Herpesvirusarten: Beitrag zur Schutzimpfung gegen die Mareksche Krankheit.

Habilitationsschrift, Tierärztliche Hochschule Hannover.

KALETA, E. F. (1981):

Diagnose und Differentialdiagnose tumoröser Krankheiten des Huhnes.

Tierärztliche Praxis **9**: 59-77.

KALETA, E. F. (1990):

Herpesviruses of birds - a review.

Avian Pathology **19**: 193-211.

KANAMORI, A., K. NAKAJIMA, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO and K. HIRAI (1986):  
Copy number of tandem direct repeats within the inverted repeats of Marek's disease virus  
DNA.

Biken Journal **29**: 83-89.

KASCHKA-DIERICH, C., G. W. BORNKAMM and R. THOMSEN (1979):

No homology detectable between Marek's disease virus (MDV) DNA and herpesvirus of the  
turkey (HVT) DNA.

Medical Microbiology and Immunology **165**: 223-239.

KAWAMURA, H., D. J. KING JR. and D. P. ANDERSON (1969):

A herpesvirus isolated from kidney cell culture of normal turkeys.

Avian Diseases **13**: 853-863.

KINGHAM, B. F., V. ZELNÍK, J. KOPÀCEK, V. MAJERCIK, E. NEY and C. J.  
SCHMIDT (2001):

The genome of herpesvirus of turkeys: comparative analysis with Marek's disease viruses.

Journal of General Virology **82**: 1123-1135.

KOZDRUN, W., E. SAMOREK-SALAMONOWICZ and H. CZEKAJ (2001):

Polymerase chain reaction for the differentiation of Marek's disease virus strains.

Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy **45**: 5-10.

KROSS, I., P. J. DAVIS and R. W. SHILLETTO (1998):

Isolation of highly cytolytic MDV strains from Germany and Spain.

Avian Pathology **27**: 313-315.

KWOK, S. and R. HIGUCHI (1989):

Avoiding false positives with PCR.

Nature **339**: 237-238.

LAROSE, R. N. and M. SEVOIAN (1965):

Avian lymphomatosis. IX. mortality and serological response of chickens of various ages to graded doses of T strain.

Avian Diseases **9**: 604-610.

LEE, L. F., B. ROIZMAN, P. G. SPEAR, E. D. KIEFF, B. R. BURMESTER and K.

NAZERIAN (1969):

Marek's disease herpesvirus: A cytomegalovirus ?

Proceedings of the National Academy of Science **64**: 952-956.

LEE, L. F., X. LIU and R. L. WITTER (1983):

Monoclonal antibodies with specificity for the three different serotypes of Marek's disease virus in chickens.

The Journal of Immunology **130**: 1003-1006.

LEE, S., M. TAKAGI, K. OHASHI, C. SUGIMOTO and M. ONUMA (2000):

Difference in the meq gene between oncogenic and attenuated strains of Marek's disease virus serotype 1.

Journal of Veterinary Medical Science **62**: 287-292.

LIU, J.-L., Y. YE, L. F. LEE and H.-J. KUNG (1998):

Transforming potential of the herpesvirus oncoprotein MEQ: morphological transformation, serum independent growth, and inhibition of apoptosis.

Journal of Virology **72**: 388-395.

MALKINSON, M., I. DAVIDSON and A. PERL (1996):

Marek's disease in turkeys.

The Veterinary Record **139**: 504.

MAOTANI, K., A. KANAMORI, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO and K. HIRAI (1986):

Amplification of a tandem direct repeat within the inverted repeats of Marek's disease virus DNA during serial in vitro passage.

Journal of Virology **58**: 657-660.

MAREK, J. (1907):

Multiple Nervenentzündung (Polyneuritis) bei Hühnern.

Deutsche Tierärztliche Wochenschrift **15**: 417-421.

McCOLL, K., B. W. CALNEK, W. V. HARRIS, K. A. SCHAT and L. F. LEE (1987):

Expression of a putative tumor-associated antigen on normal versus Marek's disease virus-transformed lymphocytes.

Journal of the National Cancer Institute **79**: 991-1000.

McDOUGALL, J. S., P. M. BIGGS, R. W. SHILLETO and B. S. MILNE (1978a):

Lymphoproliferative disease of turkeys. II. Experimental transmission and aetiology.

Avian Pathology **7**: 141-155.

McDOUGALL, J. S., P. M. BIGGS and R. W. SHILLETO (1978b):

A leukosis in turkeys associated with infection with reticuloendotheliosis virus.

Avian Pathology **7**: 557-568.

McDOUGALL, J. S., R. W. SHILLETO and P. M. BIGGS (1980):

Experimental infection and vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in the turkey.

Avian Pathology **9**: 445-454.

McDOUGALL, J. S., R. W. SHILLETO and P. M. BIGGS (1981):

Further studies on vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in turkeys.

Avian Pathology **10**: 163-169.

McKEE, G. S., A. M. LUCAS, E. M. DENINGTON and F. C. LOVE (1963):

Separation of leucotic and non-leucotic lesions in turkeys on the inspection line.

Avian Diseases **7**: 19-30.

MINSON, A. C., A. DAVISON, R. EBERLE, R. C. DESROSIERS, B. FLECKENSTEIN,  
D. J. McGEOCH, P. E. PELLET, B. ROIZMAN and D. M. J. STUDDERT (2000):

Virus Taxonomy. 7<sup>th</sup> Report of the International Committee of Taxonomy of Viruses.

In: VAN REGENMORTELT, M. H. V., C. M. FAUQUET, D. H. L. BISHOP, E. B.

CARSTENS, M. K. ESTENS, S. M. LEMON, J. MANILOFF, M. A. MAYO, D. J.

McGEOCH, C. R. PRINGLE and R. B. WICHNER (Eds.), Academic Press, San Diego,  
California, pp. 203-225.

MODROW, S. und D. FALKE (1997):

Retroviren.

In: MODROW, S. und D. FALKE (Hrsg.) Molekulare Virologie, Spektrum Akademischer  
Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford, S. 290-334.

MOELLING, K., H. GELDERBLOM, G. PAULI, R. FRIIS and H. BAUER (1975):

A comparative study of the avian reticuloendotheliosis virus: relationship to murine  
leukemia virus and viruses of the avian sarcoma-leukosis complex.

Virology **65**: 546-557.

MOTHA, M. X. J., J. R. EGERTON and A. W. SWEENEY (1984):

Some evidence of mechanical transmission of reticuloendotheliosis virus by mosquitos.

Avian Diseases **28**: 858-867.

NAITO, M., K. NAKAJIMA, N. IWA, K. ONO, I. YOSHIDA, T. KONOBE, K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO and K. HIRAI (1986):

Demonstration of a Marek's disease virus-specific antigen in tumor lesions of chickens with Marek's disease using monoclonal antibody against a virus phosphorylated protein.

Avian Pathology **15**: 503-510.

NAKAJIMA, K., K. IKUTA, S. UEDA, S. KATO and K. HIRAI (1986):

Identification with monoclonal antibodies of virus-specific DNA-binding proteins in the nuclei of cells infected with three serotypes of Marek's disease virus-related viruses.

Journal of Virology **59**: 154-158.

NAZERIAN, K. (1970):

Attenuation of Marek's disease virus and study of its properties in two different cell cultures.

Journal of the National Cancer Institute **44**: 1257-1267.

NAZERIAN, K. and B. R. BURMESTER (1968):

Electron microscopy of a herpesvirus associated with the agent of Marek's disease in cell culture.

Cancer Research **28**: 2454-2462.

NAZERIAN, K. and R. L. WITTER (1970):

Cell-free transmission and in vivo replication of Marek's disease virus.

Journal of Virology **5**: 388-397.

NAZERIAN, K., A. ELMUBARAK and J. M. SHARMA (1982):

Establishment of B-lymphoblastoid cell lines from Marek's disease virus-induced tumors in turkeys.

International Journal of Cancer **29**: 63-68.

NAZERIAN, K. and J. M. SHARMA (1984):

Pathogenesis of Marek's disease in turkeys.

Proceedings of the International Symposium on Marek's Disease, 23.-26. July, Ithaca, NY, pp. 262-267.

NAZERIAN, K., L. F. LEE, N. YANAGIDA and R. OGAWA (1992):

Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus.

Journal of Virology **66**: 1409-1413.

NEUMANN, U. (1992):

Lymphoproliferative Krankheit der Puten.

In: HEIDER, G., G. MONREAL und J. MÉSZÁROS (Hrsg.): Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels, Band I, S. 781-784. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart.

NEWTON, C. R. und A. GRAHAM (1997):

PCR.

2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin und Oxford.

NIKURA, M., Y. MATSUURA, D. ENDOH, M. ONUMA and T. MIKAMI (1992):

Expression of the Marek's disease virus (MDV) homolog of glycoprotein B of herpes simplex virus by a recombinant baculovirus and its identification as the B antigen (gp100, gp60, gp49) of MDV.

Journal of Virology **66**: 2631-2638.

OKADA, K., Y. FUJIMOTO, T. MIKAMI and K. YONEHARA (1972):

The fine structure of Marek's disease virus and herpesvirus of turkey in cell culture.

The Japanese Journal of Veterinary Research **20**: 57-68.

OKAZAKI, W., H. G. PURCHASE and B. R. BURMESTER (1970):

Protection against Marek's disease by vaccination with a herpesvirus of turkeys.

Avian Diseases **14**: 413-429.

OKOYE, J. O. A., W. EZEMA and J. N. AGOHA (1993):

Naturally occurring clinical reticuloendotheliosis in turkeys and chickens.

Avian Pathology **22**: 237-244.

ONO, K., M. TAKASHIMA, T. ISHIKAWA, M. HAYASHI, I. YOSHIDA, T. KONOBE, K. IKUTA, K. NAKAJIMA, S. UEDA, S. KATO and K. HIRAI (1985):

Partial protection against Marek's disease in chickens immunized with glycoproteins gB purified from turkey-herpesvirus-infected cells by affinity chromatography coupled with monoclonal antibodies.

Avian Diseases **29**: 533-539.

ONO, M., R. KATSURAGI-IWANAGA, T. KITAZAWA, N. KAMIYA, T. HORIMOTO, M. NIIKURA, C. KAI, K. HIRAI and T. MIKAMI (1992):

The restriction endonuclease map of Marek's disease virus (MDV) serotype 2 and a collinear relationship among three serotypes of MDV.

Virology **191**: 459-463.

ONO, M., Y. KAWAGUCHI, K. MAEDA, N. KAMIYA, Y. TOHYA, C. KAI, M. NIIKURA and T. MIKAMI (1994):

Nucleotide sequence analysis of Marek's disease virus (MDV) serotype 2 homolog of MDV serotype 1 pp38, an antigen associated with transformed cells.

Virology **201**: 142-146.

PAPPENHEIMER, A. M., L. C. DUNN and V. CONE (1929):

Studies on fowl paralysis (*neurolymphomatosis gallinarum*). I. Clinical features and pathology.

Journal of Experimental Medicine **49**: 63-86.

PATEL, J. R. and SHILLETTO, R. W. (1987a):

Characterization of lymphoproliferative disease virus of turkeys. Structural polypeptides of the C-type particles.

Archives of Virology **95**: 159-176.

PATEL, J. R. and R. W. SHILLETTO (1987b):

Diagnosis of lymphoproliferative disease virus infection of turkeys by an indirect immunofluorescence test.

Avian Pathology **16**: 367-376.

PATEL, J. R. and R. W. SHILLETTO (1987c):

Detection of lymphoproliferative disease virus by an enzyme-linked immunosorbent assay.

Epidemiology and Infection **99**: 711-722.

PATEL, J. R. and R. W. SHILLETTO (1987d):

Production of virus-specific antisera to lymphoproliferative disease virus of turkeys.

Avian Pathology **16**: 699-705.

PAUL, P. S., K. A. POMEROY, P. S. SARMA, K. H. JOHNSON, D. M. BARNES, M. C. KUMAR and B. S. POMEROY (1976):

Brief communication: Naturally occurring reticuloendotheliosis in turkeys: Transmission.

Journal of the National Cancer Institute **56**: 419-422.

PAUL, P. S., K. H. JOHNSON, K. A. POMEROY, B. S. POMEROY and P. S. SARMA (1977a):

Experimental transmission of reticuloendotheliosis in turkeys with the cell-culture-propagated reticuloendotheliosis virus of turkey origin.

Journal of the National Cancer Institute **58**: 1819-1824.

PAUL, P. S., J. H. SAUTTER and B. S. POMEROY (1977b):

Suceptibility of turkeys to Georgia strain of Marek's disease virus of chicken origin.

American Journal of Veterinary Research **38**: 1653-1656.

PAUL, P. S., R. E. WERDIN and B. S. POMEROY (1978):

Spontaneously occurring lymphoproliferative disease in ducks.

Avian Diseases **22**: 191-195.

PAYNE, L. N. (1972):

Pathogenesis of Marek's disease - a review.

In: BIGGS, P. M., G. DE THÉ and L. N. PAYNE (Eds.): Oncogenesis and herpesviruses.

International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 21-37.

PAYNE, L. N. (1976):

The pathogenesis of Marek's disease.

In: PAYNE, L. N. (Ed.) Differential diagnosis of avian lymphoid leukosis and Marek's

disease, Commission of the European Communities, Proceedings of a seminar in the EEC

programme for co-ordination of research on avian leukosis, 12<sup>th</sup> October 1975, Copenhagen,

Denmark, pp. 31-53.

PAYNE, L.N. (1985):

Pathology.

In: PAYNE, L. N. (Ed.) Marek's disease, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 43-75.

PAYNE, L. N. and P. M. BIGGS (1967):

Studies on Marek's disease. II. Pathogenesis.

Journal of the National Cancer Institute **39**: 281-302.

PAYNE, L. N. and M. RENNIE (1973):

Pathogenesis of Marek's disease in chicks with and without maternal antibody.

Journal of the National Cancer Institute **51**: 1559-1573.

PAYNE, L. N. and A. M. FADLY (1997):

Leucosis/sarcoma group.

In: CALNEK, B. W. (Ed.) Diseases of Poultry, 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Iowa, pp. 414-466.

PENG, Q., M. ZENG, Z. A. BHUIYAN, E. UBUKATA, A. TANAKA, M. NONOYAMA and Y. SHIRAZI (1995):

Isolation and characterisation of Marek's disease virus (MDV) cDNAs mapping to the BamHI-I<sub>2</sub>, BamHI-Q<sub>2</sub> and BamHI-L fragments of the MDV genome from lymphoblastoid cells transformed and persistently infected with MDV.

Virology **213**: 590-599.

PENNYCOTT, T. W. and K. VENUGOPAL (2002):

Outbreak of Marek's disease in a flock of turkeys in Scotland.

The Veterinary Record **150**: 277-279.

PERK, K., M. IANCONESCU, A. YANIV and A. ZIMBER (1978):

Lymphoproliferative disease in turkeys – structure, ultrastructure and biochemistry.

Refuah Veterinarith **35**: 29.

PERK, K., M. IANCONESCU, A. YANIV and A. ZIMBER (1979):

Morphologic characterization of proliferative cells and virus particles in turkeys with lymphoproliferative disease.

Journal of the National Cancer Institute **62**: 1483-1487.

PETERSON, D. A. and A. S. LEVINE (1971):

Avian reticuloendotheliosis virus (strain T). IV. infectivity and transmissibility in day-old cockerels.

Avian Diseases **15**: 874-883.

POWELL, P. C. (1985):

Immunity.

In: PAYNE, L. N. (Ed.) Marek's disease, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 177-201.

POWELL, P. C., K. HOWES, A. M. LAWN, B. M. MUSTILL, L. N. PAYNE, M. RENNIE and M. A. THOMPSON (1984):

Marek's disease in turkeys: The induction of lesions and the establishment of lymphoid cell lines.

Avian Pathology **13**, 201-214.

POWELL, P. C. and L. N. PAYNE (1993):

Marek's disease.

In: McFERRAN, J. B. and M. S. McNULTY (Eds.) Virus infections of birds, Elsevier, pp. 37-75.

PRINGEL, C. R. (1999):

Virus Taxonomy – 1999.

Archives of Virology **144**: 421-429.

PURCHASE, H. G. (1985):

Clinical disease and its economic impact.

In: PAYNE, L. N. (Ed.) Marek's disease, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 17-24.

PURCHASE, H. G. and P. M. BIGGS (1967):

Characterization of five isolates of Marek's disease.

Research Veterinary Science **8**: 440-449.

PURCHASE, H. G., C. LUDFORD, K. NAZERIAN and H. W. COX (1973):

A new group of oncogenic viruses: Reticuloendotheliosis, chick syncytial, duck infectious anemia and spleen necrosis viruses.

Journal of the National Cancer Institute **51**: 489-499.

- QIAN, Z., P. BRUNOVSKIS, F. RAUSCHER, L. LEE and H.J. KUNG (1995):  
The transactivation activity of Meq, a Marek's disease herpesvirus bZIP protein persistently expressed in latently-infected transformed T-cells.  
*Journal of Virology* **69**: 4037-4044.
- REECE, R. L. (1997):  
Tumors of unknown etiology.  
In: CALNEK, B. W. (Ed.) *Diseases of Poultry*, 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Iowa, pp. 489-510.
- RISPENS, B. H., H. van VLOTEN, N. MASTENBROEK, H. J. L. MAAS and K. A. SCHAT (1972):  
Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials.  
*Avian Diseases* **16**: 108-125.
- ROBINSON, F. R. and M. J. TWIEHAUS (1974):  
Isolation of the avian reticuloendotheliosis virus (strain T).  
*Avian Diseases* **18**: 278-288.
- ROIZMAN, B. (1982):  
The family Herpesviridae. General description, taxonomy and classification.  
In: *The Herpesviruses*, vol.1, pp. 347-431. Plenum Press, New York, London.
- ROSATI, S., P. ROBINO, M. C. ISAIA, G. COSTADURA and S. CERUTI SOLA (1999):  
Use of the polymerase chainreaction (PCR) for the diagnosis of viral neoplastic diseases of turkeys.  
In: XXXVII Convegno della Società Italiana di Patologia Aviaria, Florì, Italy, 1-2 October, 1989. *Selezione Veterinaria* **8/9**: 625-629.

ROSS, L. J. N., O. BASARAB, D. J. WALKER and B. WHITBY (1975):

Serological relationship between a pathogenic strain of Marek's disease virus, its attenuated derivative and herpesvirus of turkeys.

Journal of General Virology **28**: 37-47.

ROSS, L. J. N., B. MILNE and P. M. BIGGS (1983):

Restriction endonuclease analysis of Marek's disease virus DNA and homology between strains.

Journal of General Virology **64**: 2785-2790.

SARID, R., A. CHAJUT, E. GAK, Y. KIM, C. V. HIXSON, S. OROSZLAN, S. R.

TRONICK, A. GAZIT and A. YANIV (1994a):

Genome organization of a biologically active molecular clone of the lymphoproliferative disease virus of turkeys.

Virology **204**: 680-691.

SARID, R., A. CHAJUT, M. MALKINSON, S. R. TRONICK, A. GAZIT and A. YANIV (1994b):

Diagnostic test for lymphoproliferative disease virus infection of turkeys, using the polymerase chain reaction.

American Journal of Veterinary Research **55**: 769-772.

SCHAT, K. A. (1985):

Characteristics of the virus.

In: PAYNE, L. N. (Ed.) Marek's disease, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 77-112.

SCHAT, K. A. and B. W. CALNEK (1978):

Demonstration of Marek's disease tumor-associated surface antigen in chickens infected with nononcogenic Marek's disease virus and herpesvirus of turkeys.

Journal of the National Cancer Institute **61**: 855-857.

SCHAT, K. A., B. W. CALNEK and J. FABRICANT (1982):

Characterisation of two highly oncogenic strains of Marek's disease virus.

Avian Pathology **11**: 593-605.

SCHWARZBARD, Z., A. YANIV, M. IANCONESCU, K. PERK and A. ZIMBER: (1980):

A reverse transcriptase assay for the diagnosis of lymphoproliferative disease (LPD) of turkeys.

Avian Pathology **9**: 481-487.

SEVOIAN, M., D. M. CHAMBERLAIN and COUNTER, F. (1962):

Avian lymphomatosis. Experimental reproduction of the neural and visceral forms.

Veterinary Medicine **57**: 500-501.

SEVOIAN, M., D. M. CHAMBERLAIN and R. N. LAROSE (1963):

Avian lymphomatosis. New support for etiologic unity.

Proceedings of the 17<sup>th</sup> World Veterinary Congress, Hannover, pp. 1475-1476.

SEVOIAN, M, R. N. LAROSE and D. M. CHAMBERLAIN (1964):

Avian lymphomatosis. VI. A virus of unusual potency and pathogenicity.

Avian Diseases **3**: 336-347.

SHARMA, J. M. (1998):

Marek's disease.

In: SWAYNE, D. E., GLISSON, J. R., JACKWOOD, M. W., PEARSON, J. E. and W. M. REED (Eds): A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 4<sup>th</sup> edition, pp. 116-124.

SHARMA, J. M., R. L. WITTER and B. R. BURMESTER (1973):

Pathogenesis of Marek's disease in old chickens: Lesions regression as the basis for age-related resistance.

Infection and Immunity **8**: 715-724.

SHEK, W. R., B. W. CALNEK, K. A. SCHAT and C.-L. H. CHEN (1983):

Characterization of Marek's disease virus-infected lymphocytes: Discrimination between cytolytically and latently infected cells.

Journal of the National Cancer Institute **70**: 485-491.

SILVA, R. F. (1992):

Differentiation of pathogenic and nonpathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome.

Avian Diseases **36**: 521-528.

SILVA, R. F. and R. L. WITTER (1985):

Genomic expansion of Marek's disease virus DNA is associated with serial in vitro passage.

Journal of Virology **54**: 690-696.

SIMPSON, C. F., D. W. ANTHONY and F. YOUNG (1957):

Visceral lymphomatosis in a flock of turkeys.

Journal of the American Veterinary Medical Association **130**: 93-96.

SITHOLE, I., L. F. LEE and L. F. VELICER (1988):

Synthesis and processing of the Marek's disease herpesvirus B antigen glycoprotein complex.

Journal of Virology **62**: 4270-4279.

SMITH, M. W. and B. W. CALNEK (1973):

Effect of virus pathogenicity on antibody production in Marek's disease.

Avian Diseases **17**: 727-736.

SMITH, E. J. and R. L. WITTER (1983):

Detection of antibodies against reticuloendotheliosis viruses by an enzyme-linked immunosorbent assay.

Avian Diseases **27**: 225-234.

SMITH, G. D., V. ZELNIK and L. J. N. ROSS (1995):

Gene organization in herpesvirus of turkeys: identification of a novel open reading frame in the long unique region and a truncated homologue of pp38 in the internal repeats.

Virology **207**: 205-216.

SOLOMON, J. J., R. L. WITTER and K. NAZERIAN (1976):

Studies on the etiology of lymphomas in turkeys: Isolation of reticuloendotheliosis virus.

Avian Diseases **20**: 735-747.

SUGAYA, K., G. BRADLEY, M. NONOYAMA and A. TANAKA (1990):

Latent transcripts of Marek's disease virus are clustered in the short and long repeat regions.

Journal of Virology **64**: 5773-5782.

SWAYNE, D. E., O. J. FLETCHER and L. W. SCHIERMAN (1989):

Marek's disease virus-induced transient paralysis in chickens. 1. Time course association between clinical signs and histological brain lesions.

Avian Pathology **18**: 385-396.

THEILEN, G. H., R. F. ZEIGEL and M. J. TWIEHAUS (1966):

Biological studies with RE virus (strain T) that induces reticuloendotheliosis in turkeys, chickens and Japanese quail.

Journal of the National Cancer Institute **37**: 731-743.

TIPOLD, A., G. LOUPAL, J. PABST und L. VASICEK (1987):

Auftreten von Lymphoproliferativer Krankheit in Putenbeständen in Österreich.

Wiener tierärztliche Monatsschrift **74**: 312-318.

VENUGOPAL, K. (2000):

Marek's disease: an update on oncogenic mechanisms and control.

Research in Veterinary Science **69**: 17-23.

VOÛTE, E. J. and A. E. WAGENAAR-SCHAAFSMA (1974):

Een op de ziekte van Marek lijkende afwijking bij mestkalkoenen in Nederland.

Tijdschrift for Diergeneeskunde **99**: 166-169.

WERNER, O. (1988):

Mareksche Krankheit.

In BLAHA, T. (Hrsg.): Angewandte Epizootiologie und Tierseuchenbekämpfung.

VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.

WILHELMSSEN, K. C., K. EGGLETON and H. M. TEMIN (1984):

Nucleic acid sequences of the oncogene *v-rel* in reticuloendotheliosis virus strain T and its cellular homolog, the proto-oncogene *c-rel*.

Journal of Virology **52**: 172-182.

WILSON, I. G. (1997):

Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification.

Applied and Environmental Microbiology **63**: 3741-3751.

WILSON, M. R. and P. M. COUSSENS (1992):

Characterization of changes within the *Bam*HI L fragment of attenuated Marek's disease virus.

Proceedings 19<sup>th</sup> World's Poultry Congress, Amsterdam, 19.-24. September 1992, vol. 1, pp. 40-43.

WILSON, M. R., R. A. SOUTHWICK, J. T. PULASKI, V. L. TIEBER, Y. HONG and P. M. COUSSENS (1994):

Molecular analysis of the glycoprotein C-negative phenotype of attenuated Marek's disease virus.

Virology **199**: 393-402.

WITTER, R. L. (1976):

Natural mechanisms of controlling lymphotropic herpesvirus infection (Marek's disease) in the chicken.

Cancer Research **36**: 681-687.

WITTER, R. L. (1983):

Characteristics of Marek's disease viruses isolated from vaccinated commercial chicken flocks: Association of viral pathotype with lymphoma frequency.

Avian Diseases **27**: 113-132.

WITTER, R. L. (1985):

Principles of vaccination.

In: PAYNE, L. N. (Ed.) Marek's disease, Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp. 203-250.

WITTER, R. L. (1997a):

Reticuloendotheliosis.

In: CALNEK, B. W. (Ed.) Diseases of Poultry, 10<sup>th</sup> edition, Iowa State University Press, Iowa, pp. 467-484.

WITTER, R. L. (1997b):

Increased virulence of Marek's disease virus field isolates.

Avian Diseases **41**: 149-163.

WITTER, R. L. (1997c):

Avian tumor viruses: persistent and evolving pathogens.

Acta Veterinaria Hungarica **45**: 251-266.

WITTER, R. L. (2002):

Induction of strong protection by vaccination with partially attenuated serotype 1 Marek's disease viruses.

Avian Diseases **46**: 925-937.

WITTER, R. L., K. NAZERIAN, H. G. PURCHASE and G. H. BURGOYNE (1970):

Isolation from turkeys of a cell-associated herpesvirus antigenetically related to Marek's disease virus.

American Journal of Veterinary Research **31**: 525-538.

WITTER, R. L., J. J. SOLOMON, L. R. CHAMPION and K. NAZERIAN (1971):

Long term studies of Marek's disease infection in individual chickens.

Avian Diseases **15**: 346-365.

WITTER, R. L., J. M. SHARMA, J. J. SOLOMON and L. R. CHAMPION (1973):

An age-related resistance of chickens to Marek's disease: some preliminary observations.

Avian Pathology **2**: 43-54.

WITTER, R. L., J. J. SOLOMON and J. M. SHARMA (1974):

Response of turkeys to infection with virulent Marek's disease virus of turkey and chicken origins.

American Journal of Veterinary Research **35**: 1325-1332.

WITTER, R. L., E. A. STEPHENS, J. M. SHARMA and K. NAZERIAN (1975):

Demonstration of a tumor-associated surface antigen in Marek's disease.

The Journal of Immunology **115**: 177-182.

WITTER, R. L., J. M. SHARMA and A. M. FADLY (1980):

Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens.

Avian Diseases **24**: 210-232

WITTER, R. L., E. J. SMITH and L. B. CRITTENDEN (1981):

Tolerance, viral shedding and neoplasia in chickens infected with non-defective reticuloendotheliosis viruses.

Avian Diseases **25**: 374-394.

WITTER, R. L., I. L. PETERSON, E. J. SMITH and D. C. JOHNSON (1982):

Serologic evidence in commercial chicken and turkey flocks of infection with reticuloendotheliosis virus.

Avian Diseases **26**: 753-762.

WITTER, R. L. and S. W. GLASS (1984):

Reticuloendotheliosis in breeder turkeys.

Avian Diseases **28**: 742-750.

WITTER, R. L. and D. W. SALTER (1989):

Vertical transmission of reticuloendotheliosis virus in breeder turkeys.

Avian Diseases **33**: 226-235.

WITTER, R. L. and A. M. FADLY (2003):

Reticuloendotheliosis.

In: SAIF, Y. M. (Ed.) Diseases of Poultry, 11<sup>th</sup> edition, Iowa State Press, Iowa, pp.517-536.

WITTER, R. L. and K. A. SCHAT (2003):

Marek's disease.

In: SAIF, Y. M. (Ed.) Diseases of Poultry, 11<sup>th</sup> edition, Iowa State Press, Iowa, pp.407-465.

WONG, T. C. and M. M. C. LAI (1981):

Avian reticuloendotheliosis virus contains a new class of oncogene of turkey origin.

Virology **111**: 289-293.

YANIV, A., A. GAZIT, M. IANCONESCU, K. PERK, B. AIZENBERG and A. ZIMBER (1979):

Biochemical characterization of the type C retrovirus associated with lymphoproliferative disease of turkeys.

Journal of Virology **30**: 351-357.

YANIV, A., R. SARID, A. CHAJUT, E. GAK, R. ALTSTOCK, S. R. TRONICK and A. GAZIT (1995):

The lymphoproliferative disease virus (LPDV) of turkeys.

Israel Journal of Veterinary Medicine **50**: 87-95.

ZAANE, D. VAN, J. M. A. BRINKHOF, F. WESTENBRINK and A. L. J. GIELKENS (1982a):

Molecular-biological characterization of Marek's disease virus. I. Identification of virus-specific polypeptides in infected cells.

Virology **121**: 116-132.

ZAANE, D. VAN, J. M. A. BRINKHOF and A. L. J. GIELKENS (1982b):

Molecular-biological characterization of Marek's disease virus. II. Differentiation of various MDV and HVT strains.

Virology **121**: 133-146.

ZANDE, S. VAN DE, H. NAUWYNCK, W. HENDRICKX and M. PENSAERT (1997):

Prevalence of respiratory and lymphotropic viruses in turkeys in Belgium.

Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift **66**: 223-228.

ZEIGEL, R. F., G. H. THEILEN and M. J. TWIEHAUS (1966):

Electron microscopic observations on RE virus (strain T) that induces reticuloendotheliosis in turkeys, chickens and Japanese quail.

Journal of the National Cancer Institute **37**: 709-729.

ZHU, G.-S., T. OJIMA, T. HIRONAKA, T. IHARA, N. MIZUKOSHI, A. KATO, S. UEDA and K. HIRAI (1992):

Differentiation of oncogenic and nononcogenic strains of Marek's disease virus type 1 by using the polymerase chain reaction DNA amplification.

Avian Diseases **36**: 637-645.

ZIMBER, A., K. PERK, M. IANCONESCU, Y. YEGANA, A. GAZIT and A. YANIV (1983):

Lymphoproliferative disease of turkeys: Pathogenesis, viraemia and serum protein analysis following infection.

Avian Pathology **12**: 101-116.

ZIMBER, A., K. PERK, M. IANCONESCU, Z. SCHWARZBARD and A. YANIV (1984):

Lymphoproliferative disease of turkeys:

Effect of chemical and surgical bursectomy on viraemia, pathogenesis and on the humoral immune response.

Avian Pathology **13**: 277-287.



## **Anhang**

**Tabelle A: Pathologisch-anatomische Untersuchung: Übersicht über die Befundung der Organe der untersuchten Puten**

(Erklärung der Abkürzungen am Ende der Tabelle)

Nr. <sup>1</sup>	Le <sup>2</sup>	Mi	Ni	He	Da	Ma	Ne	Th	Sd	Ge	Ct	NN	Pank	Lu/LS	Ser	Kn	Haut	Sub	M m
<b>2361- 2364/96</b>	<i>3x +</i>	<i>1x +</i>	<i>3x +</i>	<i>1x +</i>	<i>1x +</i>	<i>obB</i>	<i>1x +</i>	<i>obB</i>	<i>2x +</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>						
<b>2503/96</b>	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>2713/96</b>	+	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>2714/96</b>	+	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3006/96</b>	<i>obB</i>	(+)	(+)	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3274/96</b>	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3275/96</b>	<i>obB</i>	(+)	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3276/96</b>	(+)	<i>obB</i>	<i>obB</i>	(+)	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3277/96</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3278/96</b>	<i>obB</i>	(+)	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3392/96</b>	+	+	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	+	+
<b>3393/96</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>							
<b>3394/96</b>	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3395/96</b>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3658/96</b>	(+)	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>3659/96</b>	(+)	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>

Fortsetzung Tabelle A

Nr. <sup>1</sup>	Le <sup>2</sup>	Mi	Ni	He	Da	Ma	Ne	Th	Sd	Ge	Ct	NN	Pank	Lu/LS	Ser	Kn	Haut	Sub	M m
<b>3660/96</b>	+	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	+	<i>obB</i>
<b>3758/96</b>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	+	<i>obB</i>													
<b>KK 1/97</b>	(+)	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 2/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>												
<b>KK 3/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 4/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 5/97</b>	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>											
<b>KK 6/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>												
<b>KK 7/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 8/97</b>	(+)	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>											
<b>KK 9/97</b>	+	+	+	(+)	+	+	<i>obB</i>	+	+	<i>obB</i>									
<b>KK 10/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 11/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 12/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 13/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
<b>KK 14/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>															
<b>KK 15/97</b>	(+)	<i>obB</i>																	
<b>KK 16/97</b>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>									



Fortsetzung Tabelle A

Nr. <sup>1</sup>	Le <sup>2</sup>	Mi	Ni	He	Da	Ma	Ne	Th	Sd	Ge	Ct	NN	Pank	Lu/LS	Ser	Kn	Haut	Sub	M m
KK 39/97	(+)	obB																	
KK 40/97	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	+	obB	obB	obB	obB	obB
KK 42/97	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	+	obB	obB	obB	obB	obB
KK 43/97	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	+	obB	obB	obB	obB	obB
KK 44/97	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	obB	+	obB	obB	obB	obB	obB
2112/97	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>									
2291/1/97	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	(+)	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
2291/2/97	+	+	+	+	<i>obB</i>														
1278/00	(+)	+	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>
1307/00	<i>obB</i>	+	+	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>								
1409/00	(+)	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>											
1473/00	1x +	2x +	2x +	2x +	2x +	<i>obB</i>													
1899/00	+	+	+	+	+	+	+	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	<i>obB</i>	+	<i>obB</i>	+	+	+

<sup>1</sup> **Tagebuchnummern** (Nummer/Jahr) der untersuchten Puten; Herkunft der Puten aus den Beständen siehe Tabelle 2

*kursiv* die Puten mit makroskopisch erkennbaren Veränderungen im Sinne einer tumorösen Erkrankung

<sup>2</sup> **Abkürzungen:** Le = Leber, Mi = Milz, Ni = Niere, He = Herz, Da = Magendarmtrakt excl. Ma, Ma = Drüsen- und Muskelmagen, Ne = Nerv, Th = Thymus, Sd = Schilddrüse, Ge = Gehirn, Ct = Zäkaltonsillen, NN = Nebennieren, Pank = Pankreas, Lu/LS = Lunge/Luftsack, Ser = Serosen, Kn = Knochenmark, Sub = Subkutis, Mm = Muskulatur

+ = makroskopisch sichtbare Veränderungen des Organs, (+) = unklarer Befund

**obB** = ohne besonderen Befund

**Tabelle B: Übersicht über das Vorliegen pathohistologischer Veränderungen in den Organen der untersuchten Puten**

**und in den eingesendeten Organproben (Erklärung der Abkürzungen am Ende der Tabelle)**

Nr. <sup>1</sup>	Le <sup>2</sup>	Mi	Ni	He	Da	DM	Ne	Ge	Th	Sd	BF	Kn	Pank	Haut	Sub
2361- 2364/96	3x + 1x n.d.	3x + 1x n.d.	3x + 1x n.d.	1x obB 3x n.d.	1x + 3x n.d.	n.d.	2x + 2x n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2503/96	+	obB	+	n.d.	n.d.	n.d.	obB	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
2713- 2714/96	2x +	1x + 1x obB	2x +	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1x + 1x n.d.	1x + 1x n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3006/96	obB	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.
3274/96	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3275/96	obB	obB	obB	obB	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3276/96	obB	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3277/96	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3392/96	obB	+	obB	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	+	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3393/96	obB	obB	+	n.d.	+	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	(+)	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3394/96	+	+	obB	n.d.	n.d.	+	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3395/96	obB	+	obB	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3658/96	obB	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3659/96	obB	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3660/96	(+)	+	obB	+	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	obB	n.d.	n.d.	n.d.	+	n.d.





Fortsetzung Tabelle B

Nr. <sup>1</sup>	Le <sup>2</sup>	Mi	Ni	He	Da	DM	Ne	Ge	Th	Sd	BF	Kn	Pank	Haut	Sub
<b>KK 43/97</b>	<b>obB</b>	n.d.	<b>obB</b>	n.d.	n.d.	n.d.	<b>obB</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>KK 44/97</b>	<b>obB</b>	n.d.	<b>obB</b>	n.d.	n.d.	n.d.	<b>obB</b>	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<i>2112/97</i>	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>2291/1- 2/97</i>	<i>2x +</i>	<i>2x +</i>	<i>2x +</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>1x + 1x obB</i>	<i>2x obB</i>	<i>n.d.</i>	<i>2x +</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>2277/97</i>	+	+	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	(+)	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>1278/00</i>	<i>n.d.</i>	+	+	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>1307/00</i>	<i>n.d.</i>	+	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>1409/00</i>	<b>obB</b>	(+)	<b>obB</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<b>obB</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>1473/00</i>	+	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>
<i>1899/00</i>	+	+	<b>obB</b>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	+	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	<i>n.d.</i>	+	+

<sup>1</sup> **Tagebuchnummern** der untersuchten Puten (Nummer/Jahr), Herkunft der Puten aus den Beständen siehe Tabelle 2

*kursiv* die Puten, deren Organe pathologisch-anatomische Veränderungen im Sinne einer tumorösen Erkrankung aufwiesen

<sup>2</sup> **Abkürzungen:** Le = Leber, Mi = Milz, Ni = Niere, He = Herz, Da = Darm, DM = Drüsenmagen, Ne = Nerven, Ge = Gehirn, Th = Thymus, Sd = Schilddrüse, BF = Bursa Fabricius, Kn = Knochenmark, Pank = Pankreas, Sub = Subkutis

+ = positiv im Sinne von Veränderungen wie sie durch das MKV verursacht werden

(+) = fraglich positiv bzw. nur sehr geringgradige Veränderungen

**obB** = ohne besonderen Befund

**n.d.** = nicht durchgeführt

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. E. F. Kaleta danke ich für die Überlassung des Themas. Durch seine stets gewährte Unterstützung und Gesprächsbereitschaft hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, möchte ich mich für den Zugang zu seinem Institut und die Bereitstellung der Arbeitsgeräte bedanken. Seinen MitarbeiterInnen danke ich für das freundliche Entgegenkommen.

Herrn Prof. Dr. U. Neumann, Klinik für Geflügel an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, gilt mein besonderer Dank für die herzliche Aufnahme und rege Unterstützung bei der Erstellung und Beurteilung der histologischen Präparate, sowie für den entscheidenden Gedankenanstoß zum Verlassen alter Pfade. Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. Elke Bertram und den anderen MitarbeiterInnen seiner Klinik für die fachliche Unterstützung und nette Aufnahme in Hannover bedanken.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Dr. I. Davidson, Kimron Veterinary Institute, Bet Dagan, Israel, Herrn Dr. R. L. Witter, Avian Disease and Oncology Laboratory, East Lansing, USA und Herrn Dr. C. Grund, Institut für Geflügelkrankheiten an der Ludwig-Maximilian-Universität, München für die Bereitstellung der Positivkontrollen und bei Prof. Dr. H. M. Hafez, Institut für Geflügelkrankheiten der Freien Universität Berlin für seine rege Vermittlungstätigkeit herzlich bedanken.

Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Thomas Redmann für seine freundschaftliche Unterstützung und die vielen guten Gespräche.

Frau Dr. Annette L. Bolte und Frau Dr. Rachel E. Marschang gilt mein besonderer Dank für die stets gewährte Hilfe, sowie ihre persönliche und fachliche Anteilnahme, wenn es mal wieder heiß herging.

Dr. Ayhan Yilmaz und Sabine Jäger sei für ihre Geduld und Hilfe bei der Bewältigung der Microsoft-Hürden herzlich gedankt.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Ursula Heffels-Redmann, Dr. Martin Schubert, Dr. Inge Freund, Dr. Ursula Höfle, Dr. Sandra Weigand-Lommel,, Brigitte Bönner, Ursula Reichel, Susanne Portmann, Antoinette Huhn, Sandra David und allen anderen nicht namentlich erwähnten MitarbeiterInnen unseres Instituts für ihre Hilfe und das freundliche Arbeitsklima danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Georg Hausner für die Erfüllung der vielen Extrawünsche für die Laborarbeiten.

Bei allen meinen Freunden möchte ich mich für ihre Geduld und Zuwendung bedanken. Insbesondere möchte ich Tanja Hiby für ihre tatkräftige Unterstützung und Katrin Göbel für die liebevolle Betreuung von Johanna danken.

Von Herzen danke ich Matthias und meinen Eltern für ihr Vertrauen und den gewährten Rückhalt in dieser langen Zeit. Nur durch ihre Hilfe ist die Erstellung dieser Arbeit überhaupt möglich gewesen.