

# **Nachweis von Ranavirusinfektionen bei Landschildkröten und Charakterisierung von Virusisolaten**

**CHRISTINE UHLENBROK**



**INAUGURAL-DISSERTATION** zur Erlangung des Grades eines Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie;  
Detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Auflage 2011

© 2011 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH,**  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-014-4

Verlag: DVG Service GmbH  
Friedrichstraße 17  
35392 Gießen  
0641/24466  
[geschaeftsstelle@dvg.net](mailto:geschaeftsstelle@dvg.net)  
[www.dvg.net](http://www.dvg.net)

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

# **Nachweis von Ranavirusinfektionen bei Landschildkröten und Charakterisierung von Virusisolaten**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
CHRISTINE UHLENBROK  
Tierärztin aus Detmold

Gießen 2010

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

Dekan: Prof. Dr. M. Kramer

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. h.c. E. F. Kaleta

Prof. Dr. M. Reinacher

Tag der Disputation: 23.12.2010

Für Gerdi





---

## Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1	Familie <i>Iridoviridae</i> .....	3
2.1.1	Genus <i>Iridovirus</i> .....	8
2.1.2	Genus <i>Chloriridovirus</i> .....	8
2.1.3	Genus <i>Ranavirus</i> .....	9
2.1.4	Genus <i>Lymphocystivirus</i> .....	10
2.1.5	Genus <i>Megalocytivirus</i> .....	11
2.1.6	Noch nicht einem Genus zugeordnete Viren.....	12
2.2	Ranaviren bei Amphibien und Fischen.....	13
2.3	<i>Iridoviridae</i> bei Reptilien.....	14
2.4	Ranaviren bei Reptilien.....	15
2.4.1	Ätiologie.....	17
2.4.2	Epidemiologie.....	17
2.4.3	Pathogenese.....	24
2.4.4	Klinische Symptome.....	27
2.4.5	Makroskopische und mikroskopische Pathologie.....	28
2.4.6	Diagnose.....	29
2.4.6.1	Ranavirus-spezifische PCR.....	30
2.4.6.2	Neutralisationstest.....	30
2.4.6.3	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	31
2.4.7	Differenzialdiagnosen.....	32
2.4.8	Prophylaxe.....	33
2.4.9	Therapie.....	33
2.5	Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Methoden.....	34
2.5.1	Enzyme-linked immunosorbent assay.....	34
2.5.2	Polymerasekettenreaktion.....	34
2.5.3	Restriktionsenzymanalyse.....	35
2.5.4	Sequenzanalyse.....	35
2.6	Fragestellungen der eigenen Untersuchungen.....	36

---

3	MATERIAL UND METHODEN .....	37
3.1	Bezeichnung der Schildkröten-Spezies.....	37
3.2	Zellkulturen.....	37
3.3	Materialien für die Zellkulturen .....	38
3.4	Materialien für den ELISA .....	40
3.5	Materialien für die DNA-Isolierung .....	42
3.6	Materialien für den PCR-Ansatz.....	43
3.7	Materialien für die Gelelektrophorese .....	44
3.8	Materialien für die Restriktionsenzymanalyse .....	45
3.9	Materialien für die Sequenzierung.....	47
3.10	Sonstige Materialien.....	49
3.11	Virusisolate.....	51
3.12	Tupfer- und Serumproben aus Beständen mit Erkrankungen nach Infektion mit Ranavirus.....	61
3.13	Ursprünglich zur Diagnostik auf Antikörper gegen Herpesviren eingesandte Seren.....	71
3.14	Zusammenfassung der Befunde der seziierten Schildkröten.....	72
3.15	Schildkröten zur detaillierten Untersuchung.....	75
3.16	Kultivierung von TH-1-Zellen.....	75
3.17	Anzüchtung der Virusisolate / Ranavirusnachweis mittels TH-1- Zellkultur .....	76
3.18	Endpunkt-Titration.....	77
3.19	Vermehrung der Virusisolate.....	77
3.20	Chloroformtest.....	78
3.21	5-Iod-2-Desoxy-Uridin-Test.....	79
3.22	Filtration .....	79
3.23	Virusvermehrung in verschiedenen Zellkulturen bei 28 °C und 37 °C.... .....	80
3.24	Hämagglutinationstest.....	81
3.25	Neutralisationstest.....	83
3.26	Enzym-linked immunosorbent assay.....	85
3.27	Polymerasekettenreaktion.....	91

---

3.28	PCR-Optimierung.....	94
3.29	Restriktionsenzymanalyse .....	96
3.30	Sequenzanalyse.....	97
3.31	Statistische Analysen .....	100
4	ERGEBNISSE .....	102
4.1	Zytopathischer Effekt .....	102
4.2	Chloroform- und IUDR-Test .....	105
4.3	Filtration .....	107
4.4	Virusvermehrung in verschiedenen Zellkulturen bei 28 °C und 37 °C.... .....	107
4.5	Hämagglutinationstest.....	113
4.6	Neutralisationstest.....	113
4.7	ELISA.....	116
4.7.1	Bestimmung der Konzentration der im ELISA eingesetzten Virussuspension.....	116
4.7.2	Einstellung der ELISA-Komponenten.....	116
4.7.3	Einstellung der Inkubationstemperatur.....	117
4.7.4	Überprüfung der Qualitätsparameter .....	118
4.7.4.1	Intra-Assay-Präzision.....	118
4.7.4.2	Inter-Assay-Präzision.....	119
4.7.4.3	Prüfung der Verdünnungsechtheit .....	119
4.7.5	Kreuzreaktion mit Herpesvirusantikörpern .....	121
4.7.6	Festlegung des Cut-off-Wertes .....	122
4.7.7	Auswertung der untersuchten Seren.....	123
4.7.8	Antigenetische Divergenz .....	127
4.8	PCR-Optimierung.....	128
4.9	Restriktionsenzymanalyse .....	132
4.10	Sequenzanalyse.....	138
4.11	Epidemiologische Untersuchungen zum Krankheitsverlauf in den Beständen.....	140
4.12	Schildkröten zur detaillierten Untersuchung.....	142
4.13	Entwicklung der Antikörpertiter einzelner Tieren (positive Proben)..	147

---

4.14	Versuche zur Optimierung der Zellkulturnachweise .....	152
5	DISKUSSION .....	154
5.1	Filtrationseigenschaften von Ranaviren .....	156
5.2	Virusvermehrung in verschiedenen Zellkulturen bei 28 °C und 37 °C.... .....	157
5.2.1	Einfluss der Umgebungstemperatur auf den Krankheitsverlauf .....	161
5.3	Antikörpernachweise.....	162
5.3.1	Neutralisationstest .....	162
5.3.2	ELISA.....	165
5.3.2.1	Entwicklung und Verlauf der Antikörpertiter .....	170
5.4	Methoden zum Nachweis von Ranavirus .....	173
5.5	Spezieszugehörigkeit der untersuchten Ranavirusisolate.....	177
5.6	Pathogenese und Therapie.....	180
5.7	Empfehlungen und Ausblick.....	184
6	ZUSAMMENFASSUNG .....	186
7	SUMMARY .....	189
8	LITERATURVERZEICHNIS .....	192
9	ANHANG .....	202

## Abbildungsverzeichnis

<u>Abbildung 1:</u> Replikationszyklus von FV-3 (CHINCHAR et al., 2005) .....	5
<u>Abbildung 2:</u> 100 bp-DNA-Leiter ext. ....	44
<u>Abbildung 3:</u> 1kb-DNA-Leiter .....	46
<u>Abbildung 4:</u> 1kb DNA-Stufen-Leiter .....	46
<u>Abbildung 5:</u> Marker XV.....	47
<u>Abbildung 6:</u> Schema der Anordnung der Gehege im Bestand E.....	68
<u>Abbildung 7:</u> Flussdiagramm zur Durchführung des ELISA.....	89
<u>Abbildung 8:</u> Unveränderte, konfluente, nicht inokulierte TH-1-Zellkultur (Kontrolle). Sieben Tage nach Subkultivierung der Zellen (Nativpräparat, 100 x) .....	103
<u>Abbildung 9:</u> Beginnender herdförmiger cpE bestehend aus abgerundeten Zellen in einer konfluenten TH-1-Zellkultur. Vier Tage nach der Inokulation des Ranavirus 5810/07 (Nativpräparat, 100 x).....	104
<u>Abbildung 10:</u> Fortgeschrittener herdförmiger cpE bestehend aus abgelösten Zellen im Zentrum und abgerundeten Zellen in der Peripherie des cpE im Zellrasen einer konfluenten TH-1-Zellkultur. Sechs Tage nach der Inokulation des Ranavirus 5810/07 (Nativpräparat, 100 x).....	104
<u>Abbildung 11:</u> Fast vollständig zerstörter, nur noch aus abgerundeten Zellen bestehender, vormals konfluenter Zellrasen einer TH-1-Zellkultur. Zwölf Tage nach der Inokulation des Ranavirus 5810/07 (Nativpräparat, 100 x) .....	105
<u>Abbildung 12:</u> Mit Ethidiumbromid dargestellte Banden der bei 37 °C für 12 Tage in KOP-Zellen gezüchteten Ranaviren .....	111
<u>Abbildung 13:</u> Graphische Darstellung der optischen Dichte in Abhängigkeit von den Serumverdünnungen in Zweierpotenzen.....	120
<u>Abbildung 14:</u> Graphische Darstellung der Verdünnungsstufen 1:8 bis 1:128 in logarithmischer Skalierung mit errechneten Ausgleichsgeraden sowie Angabe des Bestimmtheitsmaßes $R^2$ .....	121
<u>Abbildung 15:</u> Graphische Darstellung der 48 ELISA-Werte der Proben 1109, 1110 und 1115 (blaue Punkte), des Mittelwertes (untere rote Gerade) sowie des Cut-off-Wertes (obere rote Gerade) .....	123

---

<u>Abbildung 16:</u> Graphische Darstellung der ELISA-Werte aller 227 untersuchten Seren in der Verdünnung 1:10 (blaue Punkte) sowie des Cut-off-Wertes (rote Gerade).....	124
<u>Abbildung 17:</u> Graphische Darstellung der ELISA-Werte aller 227 untersuchten Seren in der Verdünnung 1:100 (blaue Punkte) sowie des Cut-off-Wertes (rote Gerade).....	124
<u>Abbildung 18:</u> Spaltung der DNA mit EcoRI .....	133
<u>Abbildung 19:</u> Spaltung der DNA mit HindIII.....	134
<u>Abbildung 20:</u> Spaltung der DNA mit XbaI.....	135
<u>Abbildung 21:</u> Spaltung der DNA mit KpnI.....	136
<u>Abbildung 22:</u> Arithmetische Mittelwerte der prozentualen Übereinstimmung der durch die vier Restriktionen erhaltenen Bandenmuster .....	137
<u>Abbildung 23:</u> Alignment der Sequenzen der zehn Virusisolate .....	139
<u>Abbildung 24:</u> Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit EcoRI .....	213
<u>Abbildung 25:</u> Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit HindIII .....	213
<u>Abbildung 26:</u> Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit XbaI .....	214
<u>Abbildung 27:</u> Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit KpnI .....	214

## Tabellenverzeichnis

<u>Tabelle 1:</u> Genera der Familie <i>Iridoviridae</i> .....	7
<u>Tabelle 2:</u> Spezies des Genus <i>Ranavirus</i> sowie Namen der Stämme bzw. Synonyme und die drei Spezies, die diesem Genus provisorisch zugeordnet sind (CHINCHAR et al., 2005) .....	16
<u>Tabelle 3:</u> Schildkrötenarten, aus denen Virus des Genus <i>Ranavirus</i> isoliert wurde .....	23
<u>Tabelle 4:</u> Angaben zur Isolierung und Herkunft der verwendeten Ranavirusisolate.....	51
<u>Tabelle 5:</u> Übersicht über die PCR-Befunde der Schildkröten CU8/08-CU13/08 .....	65
<u>Tabelle 6:</u> Übersicht über die Zellkultur-Befunde der Schildkröten CU8/08- CU13/08 .....	66
<u>Tabelle 7:</u> Übersicht über Vorberichte und häufigste Sektionsbefunde, der an den Folgen einer Ranavirusinfektion gestorbenen Schildkröten .....	73
<u>Tabelle 8:</u> Getestete Seren, verwendete Virusisolate sowie methodische Variationen der Virus-Serum-Inkubation der durchgeführten Neutralisationstests .....	84
<u>Tabelle 9:</u> Verdünnungen der im ELISA eingesetzten Komponenten.....	87
<u>Tabelle 10:</u> Einfluss der Chloroformbehandlung und der Kokultivierung mit IUDR (50 µg/ml) auf die Infektiositätstiter der zehn Virusisolate im Vergleich zu den Kontrolltitrationen.....	106
<u>Tabelle 11:</u> Beurteilung der Zellmorphologie ohne Virusinokulation.....	108
<u>Tabelle 12:</u> Semiquantitative Beurteilung der Morphologie der mit Ranavirus inokulierten Zellkulturen nach Kultivierung für 6 bzw. 12 Tage bei 37 °C..... .....	109
<u>Tabelle 13:</u> Semiquantitative Beurteilung der Morphologie der mit Ranavirus inokulierten Zellkulturen nach Kultivierung für 6 bzw. 12 Tage bei 28 °C..... .....	110
<u>Tabelle 14:</u> Infektiositätstiter <u>6 Tage</u> nach der 2. Passage der Ranavirusisolate bei 28 °C .....	112

---

<u>Tabelle 15:</u> Infektiositätstiter <u>13 Tage</u> nach der 2. Passage der Ranavirusisolate bei 28 °C .....	112
<u>Tabelle 16:</u> Eingesetzte Seren, verwendete Virusisolate sowie methodische Variationen der Virus-Serum-Inkubation der durchgeführten Neutralisationstests .....	114
<u>Tabelle 17:</u> Ausgewählte (durch Fettdruck hervorgehobene) Verdünnungsstufe der im ELISA eingesetzten Komponenten.....	117
<u>Tabelle 18:</u> Berechnung der Intra-Assay-Präzision .....	118
<u>Tabelle 19:</u> Berechnung der Inter-Assay-Präzision .....	119
<u>Tabelle 20:</u> ELISA-Werte von Seren mit Antikörpern gegen Schildkröten-Herpesvirus zum Ausschluss der Kreuzreaktivität .....	122
<u>Tabelle 21:</u> ELISA-Werte der fraglichen Seren.....	125
<u>Tabelle 22:</u> ELISA-Werte der positiven Seren .....	126
<u>Tabelle 23:</u> Angabe der höchsten Verdünnung der verwendeten Virusisolate, die eine spezifische Bande in den Versuchen zur PCR-Optimierung ergeben hat .....	129
<u>Tabelle 24:</u> Ergebnisse des Temperaturgradientenlaufes .....	131
<u>Tabelle 25:</u> PCR-Ergebnisse der Tupferproben B1.1-B1.18.....	141
<u>Tabelle 26:</u> Ergebnisse der Untersuchung der Rachen- und Kloakentupferproben mittels Ranavirus-spezifischer PCR .....	145
<u>Tabelle 27:</u> Ergebnisse der Untersuchung zusätzlicher Proben mittels Ranavirus-spezifischer PCR .....	146
<u>Tabelle 28:</u> Antikörpertiter der Seren von „Minni“ .....	147
<u>Tabelle 29:</u> Antikörpertiter der Seren von „Fips“ .....	148
<u>Tabelle 30:</u> Antikörpertiter des Serums von E2.1 .....	148
<u>Tabelle 31:</u> Antikörpertiter der Seren von E3.38.....	149
<u>Tabelle 32:</u> Antikörpertiter der Seren von E3.39.....	149
<u>Tabelle 33:</u> Antikörpertiter der Seren von „Gertrude“ .....	150
<u>Tabelle 34:</u> Antikörpertiter der Seren von „Agatha“ .....	151
<u>Tabelle 35:</u> Antikörpertiter der Seren von „Klaus“ .....	151
<u>Tabelle 36:</u> Angaben zu den Seren Schildkröten aus Ranavirus-infizierten Beständen .....	202



---

<u>Tabelle 37:</u> Angaben zu den Seren von Schildkröten aus Beständen ohne nachgewiesene Ranavirus-bedingte Erkrankungen .....	206
<u>Tabelle 38:</u> Geschätzte Fragmentgrößen (kbp) der zehn untersuchten Ranavirusisolate nach der Spaltung mit <b>EcoRI</b> .....	210
<u>Tabelle 39:</u> Geschätzte Fragmentgrößen (kbp) der zehn untersuchten Ranavirusisolate nach der Spaltung mit <b>HindIII</b> .....	210
<u>Tabelle 40:</u> Geschätzte Fragmentgrößen (kbp) der zehn untersuchten Ranavirusisolate nach der Spaltung mit <b>XbaI</b> .....	211
<u>Tabelle 41:</u> Geschätzte Fragmentgrößen (kbp) der zehn untersuchten Ranavirusisolate nach der Spaltung mit <b>KpnI</b> .....	212
<u>Tabelle 42:</u> Ergebnisse (ELISA-Werte) aller 227 mittels ELISA (Ranavirus 882/96) untersuchten Seren .....	215

**Abkürzungsverzeichnis**

A	Adenin
ATCC	American Type Culture Collection
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BF-2	Bluegill Fry Zellen
BGM	Buffalo Green Monkey Kidney Zellen
BHK	Baby Hamster Kidney Zellen
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
Ca	Calcium
CEF	Chicken Embryo Fibroblasts
CELC	Chicken Embryo Liver Zellen
CHSE	Chinook Salmon Embryo Zellen
CK	Grass Carp Kidney Zellen
CO	Grass Carp Ovary Zellen
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
cpE	zytopathischer Effekt
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CVUA OWL	Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDBJ	Data Bank of Japan
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECACC	European Collection of Cell Cultures

---

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHNV	Epizootic haematopoietic necrosis virus
EK	Einschlusskörperchen
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
EPC	Epithelioma Papillosum Cyprini Zellen
FHM	Fathead Minnow Zellen
FKS	Fetales Kälberserum
FV-3	Frog virus 3
G	Guanin
GL-1	Gekko Lung Zellen
HCl	Salzsäure
High five™	<i>Trichoplusia ni</i> Ovarian Zellen
IBC	inclusion body-bearing cells
IIV-3	Invertebrate iridescent virus 3
IIV-6	Invertebrate iridescent virus 6
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
ISKNV	Infectious spleen and kidney necrosis virus
IUDR	5-Iod-2-Desoxy-Uridin
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KID <sub>50</sub>	Kultur-infektiöse Dosis 50 %
konz.	konzentriert
KOP	Rind Ösopharynxgewebe Zellen
LCDV-1	Lymphocystis disease virus 1
LCDV-2	Lymphocystis disease virus 2
LMBV	Largemouth bass virus
MCP	Major Capsid Protein
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney Zellen
MEM	Minimum Essential Medium Eagle

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
Na	Maus Neuroblastom Zellen
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NT	Neutralisationstest
OD	Optische Dichte
OIE	World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties)
ORF	Open reading frame
p.a.	pro analysi
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Pike Gonad Zellen
pH	pondus hydrogenii
p.i.	post infectionem
PK(15)	Pig Kidney Zellen
p.o.	per os
R1	Rainbow Trout Liver Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
RTG-2	Rainbow Trout Gonad Zellen
SF-21	<i>Spodoptera frugiperda</i> Pupal Ovarian Zellen
SFT	Schaf Thymus Zellen
spp.	species pluralis
T	Thymin
TBS	Tris Buffered Saline
TH-1	Terrapene Heart Zellen
Tk	Toad Kidney Zellen
Tm	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt

---

Vero	African Green Monkey Kidney Zellen
VH2	Viper Heart Zellen



## 1 EINLEITUNG

Viren des Genus *Ranavirus* gehören zur Familie *Iridoviridae*. *Iridoviridae* sind große Viren mit doppelsträngiger DNA, die Arthropoden, Fische, Amphibien und Reptilien infizieren und dort Erkrankungen mit unterschiedlich schwerem Verlauf verursachen können (CHINCHAR et al., 2005).

Viren des Genus *Ranavirus* können Krankheitssymptome bei Fischen, Amphibien und Reptilien hervorrufen (CHINCHAR et al., 2005). Die Erstisolierung eines *Ranavirus* gelang GRANOFF et al. (1965) aus einem Frosch (*Rana pipiens*) mit renalem Adenokarzinom, das als Frog virus 3 (FV-3) bezeichnet wird. Dieses Virus ist das Referenzvirus des Genus *Ranavirus* (CHINCHAR et al., 2005).

Lange Zeit wurde den Ranaviren wenig Beachtung geschenkt. Seit den 1980er Jahren wird weltweit ein Rückgang von Amphibienpopulationen beobachtet. Als Ursachen für dieses globale Amphibiensterben werden unter anderem Infektionen mit Ranaviren vermutet (CUNNINGHAM et al., 1996; AHNE et al., 1997; DAZAK et al., 1999; CHINCHAR, 2002; GREEN et al., 2002). Aufgrund dieser Vermutung wurde die Forschung über Ranaviren bei Amphibien intensiviert (GOORHA und MURTI, 1982; LEE und WILLIS, 1983; CHINCHAR et al., 1984; MAO et al., 1996; WILLIAMS, 1996; CHINCHAR, 2002; ESSBAUER und AHNE, 2001; TAN et al., 2004; CHINCHAR et al., 2005).

Über Erkrankungen nach Ranavirusinfektionen bei Reptilien existieren bisher nur wenige Berichte. In fast allen Publikationen handelt es sich bei den betroffenen Tieren um Schildkröten. Die meisten dieser Berichte wurden erst ab Ende der 1990er Jahre veröffentlicht (WESTHOUSE et al., 1996; ARIEL, 1997; CHEN et al., 1999; MARSCHANG et al., 1999; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2008).

Im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe (Standort Detmold) werden Proben von Reptilien aus dem gesamten Gebiet der Bundesrepublik Deutschland untersucht. Nach einem früher nur sporadischen Auftreten von Erkrankungen nach Infektionen mit Ranaviren wurden im Jahr 2007 diese Viren vermehrt isoliert. Es waren Landschildkröten aus mehreren Beständen betroffen. Die erkrankten Landschildkröten zeigten häufig Beläge im Maul, zum Teil Konjunktivitis oder Anzeichen einer Atemwegserkrankung. Viele der er-

Bei Fischen verursachen Ranaviren meist systemische Infektionen mit hoher Morbidität und Mortalität (AHNE et al., 1997; MAO et al., 1997). WHITTINGTON und REDDAKLIFF (1995) untersuchten den Einfluss der Wassertemperatur auf den Krankheitsverlauf nach einer Infektion von Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV). Flussbarsche zeigten sich stärker empfänglich für EHNV-Infektionen als Regenbogenforellen. Bei höheren Temperaturen (19-21 °C) trat eine nur kurze Inkubationszeit auf. Bei kühleren Temperaturen verlängerte sich die Inkubationszeit bzw. es traten keine Erkrankungen mehr auf. Diese Erkenntnisse stimmen mit den Beobachtungen in der Natur überein, dass Flussbarsche schwerer erkranken und diese Erkrankungen meist in den Sommermonaten auftreten.

Zur Untersuchung des kausalen Zusammenhangs zwischen dem Nachweis von Ranaviren und den klinischen Symptomen wurden erfolgreich verlaufende Infektionsversuche durchgeführt (SPEARE und SMITH, 1992; CULLEN et al., 1995). Ranaviren können sogar Tierklassenschranken überspringen, weil nachgewiesen werden konnte, dass Fische mit einem Amphibienisolat infiziert werden können (MOODY und OWENS, 1994).

### **2.3 Iridoviridae bei Reptilien**

Die Erstbeschreibung einer viralen Infektion bei Reptilien betraf ein Iridovirus (JACOBSON, 2007). CHATTON und BLANC (1914) hielten die intraerythrozytären Einschlüsse jedoch für einen Einzeller und nannten ihn *Pirhemocytion tarentolae*. Bei Amphibien wurden ähnliche Einschlüsse gefunden, die ebenfalls als Einzeller angesehen und *Toddia* genannt wurden. Beide Einzeller wurden im weiteren Verlauf bei verschiedenen Reptilien beschrieben (JACOBSON, 2007). MARQUARDT und YAEGER (1967) vermuteten, dass *Pirhemocytion* und *Toddia* miteinander verwandt sind. 1966 konnten STEHBENS und JOHNSTON anhand von elektronenmikroskopischen Untersuchungen von *Pirhemocytion* nachweisen, dass es sich bei den Einschlüssen um Ansammlungen ikosaederförmiger Viren handelt.



---

Bei mehreren Reptilienspezies treten Viren der Genera *Iridovirus* und *Ranavirus* sowie das noch nicht einem Genus zugeordnete Erythrocytic necrosis virus auf. Iridoviren wurden aus verschiedenen Echsen isoliert (JUST et al., 2001; MARSCHANG et al., 2002; MARSCHANG et al., 2005). Ranavirusinfektionen wurden bei Echsen, Schlangen und vor allem bei Schildkröten nachgewiesen (s. Punkt 2.4.2). Ebenfalls bei Echsen, Schlangen und Schildkröten wurde das Erythrocytic necrosis virus dokumentiert (STEBBENS und JOHNSTON, 1966; TELFORD und JACOBSON, 1993; JOHNSRUDE et al., 1997; ALVES DE MATOS et al., 2002; MARSCHANG und CHITTY, 2004).

## 2.4 Ranaviren bei Reptilien

Zurzeit werden sechs verschiedene Spezies innerhalb des Genus *Ranavirus* unterschieden. *Ambystoma tigrinum* virus, Bohle iridovirus, Epizootic haematopoietic necrosis virus, European catfish virus, Santee-Cooper ranavirus und die Typspezies Frog virus 3. Zur Demarkierung zwischen den sechs Spezies werden mehrere Kriterien verwendet. Es müssen Unterschiede im Profil des Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, der DNA-Sequenz-Analyse, des Virus-Protein-Profiles und der Wirtsspezifität vorhanden sein (CHINCHAR et al., 2005).

Tabelle 2 gibt die sechs Spezies des Genus *Ranavirus* an sowie die Namen der Stämme bzw. Synonyme der Spezies. Zusätzlich sind die drei Spezies aufgeführt, die zurzeit provisorisch dem Genus *Ranavirus* zugeordnet werden. In Fettdruck sind die Stämme bzw. Spezies markiert, die aus Schildkröten isoliert wurden.

**Tabelle 2:** Spezies des Genus *Ranavirus* sowie Namen der Stämme bzw. Synonyme und die drei Spezies, die diesem Genus provisorisch zugeordnet sind (CHINCHAR et al., 2005)

<u>Genus <i>Ranavirus</i></u>	
Spezies	Stämme und Synonyme
<i>Ambystoma tigrinum</i> virus	<i>Ambystoma tigrinum</i> virus, Regina ranavirus
Bohle iridovirus	Bohle iridovirus
Epizootic haematopoietic necrosis virus	Epizootic haematopoietic necrosis virus
European catfish virus	European catfish virus, European sheatfish virus
Frog virus 3	<b>Box turtle virus 3</b> , <i>Bufo bufo</i> United Kingdom virus, <i>Bufo marinus</i> Venezuelan iridovirus 1, Frog virus 3, Lucké triturus virus 1, <i>Rana temporaria</i> United Kingdom virus, Redwood Park virus, Stickleback virus, Tadpole edema virus, Tadpole virus 2, Tiger frog virus, <b>Tortoise virus 5</b>
Santee-Cooper ranavirus	Doctor fish virus, Guppy virus 6, Santee-Cooper ranavirus, (Largemouth bass virus)
Provisorische Spezies: <i>Rana esculenta</i> iridovirus Singapore grouper iridovirus <b>Testudo iridovirus</b>	

Mehrere Studien wurden durchgeführt, um neue Isolate anhand von Restriktionsenzymanalyse und Sequenzanalyse verwandtschaftlich zuzuordnen. Die meisten dieser Isolate bilden ihrer geographischen und taxonomischen (z. B. Fisch- oder Amphibienvirus) Herkunft entsprechend Gruppen (MAO et al., 1997; Tidona et al., 1998; MAO et al., 1999; HYATT et al., 2000; Tan et al., 2004). Wie auch aus Tabelle 2 ersichtlich ist, gehören die Ranavirusisolate aus Schildkröten, soweit sie sich einer der sechs Spezies zuordnen lassen, zur Spezies Frog virus 3.

Für die Sequenzanalyse wird meist das Major Capsid Protein genutzt. Die Mitglieder der Familien *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae* und *Asfarviridae* weisen ein evolutinär eng verwandtes MCP auf, was sich in einer starken Übereinstim-

mung der Basenfolge äußert. Trotzdem sind genügend Unterschiede vorhanden, um auch nah verwandte Iridovirusisolate unterscheiden zu können (MAO et al., 1996; TIDONA et al., 1998).

#### 2.4.1 Ätiologie

Viren des Genus *Ranavirus* können Reptilien infizieren und dort schwere Erkrankungen hervorrufen. DASZAK et al. (1999) berichten, dass Ranavirusbedingte Erkrankungen bei Amphibien häufig bei kaltem Wetter auftreten. Die Viren können bei niedrigen Temperaturen möglicherweise am Boden von Gewässern überdauern und durch Vektoren (Boote, Netze, Vögel etc.) verbreitet werden (DASZAK et al., 1999).

Die Infektiösität der Ranaviren nimmt bei pH 2,0-3,0 und bei Exposition von Temperaturen über 50 °C stark ab. Ranaviren werden durch Behandlung mit Ether, Chloroform, Natriumdeoxychlorat und Phospholipase A inaktiviert (CHINCHAR et al., 2005).

#### 2.4.2 Epidemiologie

Es gibt bisher nur wenige Berichte über Ranavirusinfektionen bei Reptilien. In den meisten Publikationen werden Schildkröten als betroffene Spezies genannt. Nur zwei Publikationen beschreiben Ranavirusinfektionen bei Schlangen und Echsen. In einer der beiden Publikationen wurden juvenile Grüne Baumpythons (*Chondropython viridis*) als betroffene Spezies genannt. Nach einem illegalen Import von Indonesien nach Australien erkrankten vier von zehn Baumpythons. Drei der kranken Tiere starben. Das vierte erkrankte Tier genas ohne therapeutische Hilfen (HYATT et al., 2002). Der zweite Fall betrifft einen Madagassischen Plattschwanzgecko (*Uroplatus fimbriatus*). Das Geckowebchen, eine vier Jahre alte Nachzucht, starb plötzlich nach zweiwöchiger Inappetenz (MARSCHANG et al., 2005).

Es existieren mehrere Berichte über Erkrankungen bei Schildkröten (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; ARIEL, 1997;

CHEN et al., 1999; MARSCHANG et al., 1999; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). Aus den Angaben der älteren Publikationen (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996) ist zu entnehmen, dass die isolierten Viren nur aufgrund des elektronenmikroskopischen Aussehens der Familie *Iridoviridae* zugeordnet wurden und keine Bestimmung des Genus vorgenommen wurde.

HELDSTAB und BESTETTI (1982) beschrieben eine spontane virale Hepatitis bei einer Griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni*). Diese Schildkröte zeigte Anorexie und starb nach einer Krankheitsdauer von zwei Tagen. Daraufhin wurde sie zur Sektion an das Institut für Tierpathologie der Universität Bern geschickt. In der Sektion wurde eine fokale nekrotisierende Hepatitis, eine fokale nekrotisierende Enteritis sowie eine konfluente nekrotisierende Splenitis festgestellt. Elektronenmikroskopisch konnten zahlreiche intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in Leber und Darm festgestellt werden.

Ebenfalls in der Schweiz beschrieben MÜLLER et al. (1988) eine Iridovirus-Epidemie bei Griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*). Ein Zoohändler hatte aus Jugoslawien 2.000 Griechische Landschildkröten importiert. 200 Schildkröten starben innerhalb eines Monats trotz Therapie mit Gentamicin-Sulfat, Fenbendazol, Vitaminen und NaCl-Glukose. Dabei zeigten sich zwei unterschiedliche Krankheitsverläufe. Die Schildkröten, die akut innerhalb von ein bis zwei Tagen starben, zeigten lediglich ein Hängenlassen des Kopfes, Maulatmung und ein subkutanes Halsödem. Die Schildkröten mit einem subakuten Verlauf wiesen überwiegend eine purulente Rhinitis und Konjunktivitis, Pneumonie, ausgeprägte Stomatitis ulzerosa mit foetor ex ore und massiver Anasarka auf. In der Sektion wurde bei allen Schildkröten ein subkutanes Ödem, multiple, miliare, helle Herde in Leber und Milz, eine Hepatosplenomegalie, purulent-fibrinöse Beläge auf der nekrotischen Zunge sowie in Pharynx und Larynx, eine striäre Hyperämie der Ösophagus- und Magenmukosa, Oxyuren spp. im Zäkum, eine derbe Konsistenz der Lunge, eine gallertige Leptomeninx sowie ein ödematisiert erscheinendes Gehirnparenchym festgestellt.

WESTHOUSE et al. (1996) berichten von einem Fall bei einer Georgia-Gopherschildkröte (*Gopherus polyphemus*) aus Florida. Ein wildlebendes adul-

tes Männchen war 1992 mit Anzeichen einer Erkrankung der oberen Atemwege aufgefallen. Trotz Behandlung mit Enrofloxacin, Vitamin A und B-Komplex sowie Nutrical® verschlechterte sich sein Zustand, so dass das Männchen neun Tage nach seinem Auffinden eingeschläfert wurde. In der Sektion zeigte sich eine schwere, ulzerativ-nekrotisierende Pneumonie, eine multifokale, ulzerativ-nekrotisierende Tracheitis und Ösophagitis. In den geschädigten Gewebearten konnten große, basophile, intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen nachgewiesen werden.

In der neueren Literatur (ARIEL, 1997; CHEN et al., 1999; MARSCHANG et al., 1999; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2008) wurden die isolierten Viren aufgrund von Restriktionsenzymanalyse, Sequenzanalyse oder Ranavirus-spezifischer PCR dem Genus *Ranavirus* zugeordnet.

Laut ARIEL (1997) sind junge Schildkröten der Arten Krefftt-Spitzkopfschildkröte (*Emydura krefftii*) und Breitbrustschildkröte (*Elseya latisternum*) hoch empfänglich für das zu den Ranaviren gehörende Bohle Iridovirus, wohingegen Adulte resistent sein sollen.

MAO et al. (1997) verglichen neun zur Familie *Iridoviridae* zählende Virusisolate anhand des Profils der Protein-Synthese, der Restriktionsenzymanalyse und der Sequenzanalyse des Major Capsid Proteins. Alle neun untersuchten Isolate wiesen eine nahe Verwandtschaft mit FV-3 auf. Unter diesen waren zwei Isolate aus Reptilien. Eines wurde aus einer Carolina-Dosenschildkröte (*Terrapene carolina carolina*) und das andere aus einer Vierzehenschildkröte (*Testudo horsfieldii*) isoliert. Beide Isolate stammen aus Nordamerika. Über die Umstände der Virusisolierung sind keine Angaben mitgeteilt worden.

Im späten Sommer 1996 starben sieben juvenile Griechische Landschildkröten (*Testudo hermanni*), die in einem schweizerischen Zoo in einer Gruppe zusammen gehalten wurden (MARSCHANG et al., 1998; MARSCHANG et al., 1999). Alle sieben Tiere wurden pathologisch untersucht. Dabei zeigte sich die Mukosa der Maulhöhle, der Zunge, des Pharynx, des Ösophagus und des Darms hyperämisch, an vielen Stellen ulzeriert und von gelblichem, fibronekrotischem Material bedeckt. In der Leber waren miliare, weiße Verfärbungen zu sehen. Aus dem Gewebe von zwei betroffenen Tieren wurden Ranaviren in *Terrapene*

dem Gewebe von zwei betroffenen Tieren wurden Ranaviren in *Terrapene heart*-Zellkultur (TH-1) isoliert.

In chinesischen Schildkrötenfarmen tritt immer häufiger die „red neck disease“ auf (CHEN et al., 1999). Im Januar 1997 fand ein schwerer Ausbruch dieser Erkrankung in einer Farm mit chinesischen Weichschildkröten (*Trionyx sinensis*) in Shenzhen (China) statt. Erkrankt waren typischerweise junge Schildkröten mit einer Körpermasse von vier bis sechs Gramm. Die Farmer versuchten ohne Erfolg, die Krankheit mit der Gabe von Antibiotika zu bekämpfen. Die Mortalitätsrate schwankte zwischen 10 und 80 Tieren pro Tag. Bei seziierten Schildkröten ließen sich zusätzlich zu den hämorrhagischen Hautveränderungen und der Schwellung des Halses hämorrhagische Petechien auf der Leberoberfläche nachweisen. Ein Virus wurde aus Leber- und Nierengewebe von gestorbenen Schildkröten in Grass Carp Ovary-Zellkultur (CO) isoliert und der Familie *Iridoviridae* zugeordnet. ZHAO et al. (2007) konnten das Virus durch Sequenzierung des MCP-Gens als Mitglied des Genus *Ranavirus* identifizieren (99,1 % Übereinstimmung mit FV-3).

DE VOE et al. (2004) beschreiben eine Ranavirus-bedingte Erkrankung bei Carolina-Dosenschildkröten (*Terrapene carolina carolina*). Aus einer großen Gruppe privat gehaltener nordamerikanischer Schildkröten in North Carolina erkrankten im Herbst 2002 sieben Carolina-Dosenschildkröten. Die sieben Schildkröten zeigten Hautabszesse, Ulzerationen und Abszesse in der Maulhöhle, Atemnot, Anorexie und Lethargie. Fünf der betroffenen Tiere starben trotz Behandlung mit Antiinfektiva und Flüssigkeitssubstitution. In der Sektion zeigten sich Läsionen in der Kutis und der Mukosa, hyperämisches und ödematöses Lungengewebe, eine Splenomegalie und eine vergrößerte, gelbe Leber. Aus zwei der gestorbenen Schildkröten wurden Ranaviren in Toad Kidney-Zellkultur (TK) isoliert.

Ebenfalls aus einer Carolina-Dosenschildkröte (*Terrapene carolina carolina*) isolierten ALLENDER et al. (2006) in Tennessee ein Ranavirus. Ein freilebendes adultes Weibchen fiel im Oktober 2003 wegen Lethargie sowie Augen- und Nasenausfluss auf. In diesem Fall waren vor allem die intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in zirkulierenden Leukozyten auffällig. Die Schildkröte starb

trotz Behandlung mit Ceftazidime, Normosol-R, Enrofloxacin sowie Vitamin A und D. In der Sektion wurden multiple, verschmelzende, gelbliche Beläge in der Maulhöhle, auf der Zunge, dem Pharynx und Larynx sowie miliare, rote Verfärbungen in der Magenmukosa nachgewiesen. Aus Milzgewebe wurde Ranavirus in TH-1-Zellkultur isoliert und mit Hilfe einer PCR nachgewiesen.

Ein Bericht über eine Ranavirus-bedingte Erkrankung einer Südafrikanischen Pantherschildkröte (*Geochelone pardalis pardalis*) wurde von BENETKA et al. (2007) vorgestellt. Dabei handelte es sich um ein 62 kg schweres, adultes Weibchen, welches in Österreich kurze Zeit nach dem Import aus Äthiopien erkrankte. Das Weibchen wies Nasenausfluss, eine hochgradige, nekrotisierende Stomatitis, Dehydrierung, Apathie und Anorexie auf. Bei diesem Tier konnte neben einem Ranavirus zusätzlich mittels PCR ein Chelonid-Herpesvirus nachgewiesen werden. Das Weibchen wurde einen Monat lang mit nur mäßigem Erfolg mit Antibiotika und Flüssigkeitssubstitution behandelt und erholte sich vier Monate nach Ende der Behandlung vollständig.

JOHNSON et al. (2008) beschreiben fünf Fälle von Ranavirus-Infektionen in den USA. Die einzelnen Fälle werden nachfolgend wiedergegeben. Gestorbene Schildkröten zeigten in der Sektion als häufigsten Befund eine nekrotisierende und ulzerative Stomatitis oder Ösophagitis, eine fibrinöse, nekrotisierende Splenitis und eine multizentrische, fibrinöse Vaskulitis. Bei allen seziierten Schildkröten konnte Ranavirus in TH-1-Zellkultur isoliert und mittels PCR nachgewiesen werden.

Aus einer Gruppe bestehend aus drei weiblichen und zwei männlichen Burma-Sternschildkröten (*Geochelone platynota*) in Georgia erkrankten im Juni 2003 zwei Weibchen und ein Männchen. Sie zeigten Nasenausfluss, Konjunktivitis und ein hochgradiges subkutanes Halsödem. Die Schildkröten wurden mit Antiinfektiva behandelt. Ein Weibchen starb drei Tage nach dem ersten Auftreten der Krankheitssymptome (JOHNSON et al., 2008).

Eine wildelebende, erkrankte Georgia-Gopherschildkröte (*Gopherus polyphemus*) wurde im Juli 2003 in Florida gefunden. Die Schildkröte wies eine Schwellung der Augenlider sowie Augen- und Nasenausfluss auf. Da sich ihr Allge-

meinbefinden trotz Verabreichung von Antiinfektiva und Flüssigkeitssubstitution verschlechterte, wurde sie eingeschläfert (JOHNSON et al., 2008).

In einem privaten Naturschutzgebiet in Pennsylvania mit Carolina-Dosenschildkröten (*Terrapene carolina carolina*) starben von August bis November 2003 15 von 66 Tieren. Neun der Schildkröten wurden tot aufgefunden. Die übrigen sechs Schildkröten wiesen eine Schwellung der Augenlider, Augenausfluss und Ausfluss aus dem Maul auf. Die Schildkröten wurden ohne Erfolg mit Augensalbe sowie zwei der Tiere mit Antiinfektiva behandelt (JOHNSON et al., 2008).

Zwei erkrankte, wildlebende Carolina-Dosenschildkröten (*Terrapene carolina carolina*) wurden im Bundesstaat New York mit Augenausfluss, Schwellung der Augenlider, Ohrabszessen und käsigen, gelben Belägen in der Maulhöhle gefunden. Eine der beiden Schildkröten starb in der folgenden Nacht. Bei der anderen Schildkröte wurde der Ohrabszess entleert, und sie wurde mit Antiinfektiva behandelt. Ihr Allgemeinbefinden verschlechterte sich weiter und sie starb einen Monat nach ihrem Auffinden (JOHNSON et al., 2008).

Eine wildlebende Florida-Dosenschildkröte (*Terrapene carolina bauri*) aus Florida zeigte im Oktober 2004 ödematöse Augenlider, Augen- und Nasenausfluss sowie gelblich-weiße Beläge in der Maulhöhle. Aufgrund des sich trotz Analgetika, Flüssigkeitssubstitution sowie Vitamin B-Gabe verschlechternden Allgemeinbefindens wurde sie nach drei Tagen eingeschläfert (JOHNSON et al., 2008).

Des Weiteren wiesen JOHNSON et al. (2008) mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung Iridovirus-ähnliche Partikel in drei archivierten Paraffinblöcken nach. Zwei der Blöcke stammten von einem Massensterben im Juli und August 1991 in Georgia, bei welchem mehr als dreißig tote und zwei erkrankte Carolina-Dosenschildkröten (*Terrapene carolina carolina*) gefunden wurden. Die beiden erkrankten Schildkröten waren lethargisch und zeigten Augenausfluss sowie weiße, käsige Beläge in der Maulhöhle. Der dritte Block stammt ebenfalls von einer Carolina-Dosenschildkröte (*Terrapene carolina carolina*). Diese starb 1998 plötzlich zusammen mit weiteren Carolina-Dosenschildkröten und nicht näher benannten Schildkrötenarten in einer privaten Haltung in Texas.



Somit sind Ranavirusinfektionen bei Schildkröten (Tabelle 3) weltweit verbreitet (Europa, USA, China, Australien). Es sind nicht nur Land- sondern auch Wasserschildkröten betroffen. Sowohl bei Wildtieren als auch bei in Gefangenschaft gehaltenen Schildkröten sind nach Infektion mit Ranavirus Erkrankungen meist mit Todesfolge dokumentiert worden.

**Tabelle 3:** Schildkrötenarten, aus denen Virus des Genus *Ranavirus* isoliert wurde

Betroffene Art	Wissenschaftlicher Name	Quellen
Griechische Landschildkröte	<i>Testudo hermanni</i>	HELDSTAB und BESTETTI, 1982 *; MÜLLER et al., 1988 *; MARSCHANG et al., 1999
Georgia-Gopherschildkröte	<i>Gopherus polyphemus</i>	WESTHOUSE et al., 1996 *; JOHNSON et al., 2008
Breitbrustschildkröte	<i>Eseya latisternum</i>	ARIEL, 1997
Krefftt-Spitzkopfschildkröte	<i>Emydura krefftii</i>	ARIEL, 1997
Vierzehenschildkröte	<i>Testudo horsfieldii</i>	MAO et al., 1997
Carolina-Dosenschildkröte	<i>Terrapene carolina carolina</i>	MAO et al., 1997; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2008
Chinesische Weichschildkröte	<i>Trionyx sinensis</i>	CHEN et al., 1999
Südafrikanische Pantherschildkröte	<i>Geochelone pardalis pardalis</i>	BENETKA et al., 2007
Burma-Sternschildkröte	<i>Geochelone platynota</i>	JOHNSON et al., 2008
Florida-Dosenschildkröte	<i>Terrapene carolina bauri</i>	JOHNSON et al., 2008
Östliche Schmuck-Dosenschildkröte	<i>Terrapene ornata ornata</i>	JOHNSON et al., 2007
Rotwangen-Schmuck-Schildkröte	<i>Trachemys scripta elegans</i>	JOHNSON et al., 2007

\* keine Genusbestimmung des Virus genannt

### 2.4.3 Pathogenese

Die Pathogenese nach einer Infektion mit Ranavirus ist noch weitgehend unbekannt. Die meisten Erkenntnisse wurden bisher durch Untersuchung der Erkrankungen durch Ranavirus von Amphibien und Fischen gewonnen. Ranaviren können mit kontaminiertem Futter, durch parenterale Infektion sowie Exposition in einer virushaltigen Umwelt übertragen werden (CHINCHAR et al., 2005). Eine vertikale Übertragung von Ranaviren wurde bisher nicht beschrieben.

Möglichensfalls können mit Ranavirus infizierte Amphibien ein Reservoir für Ranavirus bei Schildkröten darstellen. Ein Ranavirusisolat konnte von Amphibien auf Fische überspringen, letztere infizieren und Krankheitssymptome auslösen (MOODY und OWENS, 1994). Da Ranaviren von einer auf eine andere Tierklasse übertragbar sind, erscheint es möglich, dass Ranaviren auch von Amphibien auf Reptilien übertragen werden können. Ranaviren von Reptilien sind dem Amphibienvirus FV-3 ähnlich (MAO et al., 1997). JOHNSON et al. (2008) konnten zeigen, dass Ranaviren aus einer erkrankten Burma-Sternschildkröte (*Geochelone platynota*) sowie aus einem erkrankten Südlichen Leopardfrosch (*Rana utricularia*), die beide in unmittelbarer Nachbarschaft gefunden wurden, dasselbe Restriktionsenzymprofil aufweisen.

Auch persistent infizierten, asymptomatischen Amphibien, die erwiesenermaßen vorkommen können, wird eine Rolle für das Aufflammen der Erkrankung in Wildbeständen zugeschrieben (BRUNNER et al., 2005).

Aus Schildkröten isolierte Ranaviren unterscheiden sich zum Teil in ihrem Bandenmuster der Restriktionsenzymanalyse. Schildkröten werden folglich von unterscheidbaren Ranaviren befallen (JOHNSON et al., 2008).

In wildlebenden Populationen scheinen Infektionen bzw. Krankheiten durch Ranavirus selten vorzukommen. Mit Hilfe eines ELISA (JOHNSON et al., 2007; s. Punkt 2.4.6.3) wurde das Vorhandensein von Antikörpern im Serum von frei lebenden Georgia-Gopherschildkröten (*Gopherus polyphemus*) im Südosten der USA untersucht. Von ca. 1.000 untersuchten Seren wiesen nur 15 Tiere (1,5 %) messbare Antikörpertiter auf. Vermutlich spiegelt dieser Anteil nicht die Zahl der tatsächlichen, vorausgegangenen Infektionen wider, da in Transmissi-

onsstudien nachgewiesen werden konnte, dass eine hohe Mortalität auftreten kann (JOHNSON und JACOBSON, 2008).

BRUNNER et al. (2005) untersuchten anhand von Tiger-Salamandern (*Ambystoma tigrinum*) den Einfluss der Virusdosis auf den Verlauf der Ranavirusinfektion. Sie stellten fest, dass mit höherer Dosis die Dauer der Inkubationszeit sank und die Morbidität und die Mortalität anstiegen, die Letalität jedoch gleich blieb. Die Virulenz der Ranaviren wird außer von der Dosis auch vom Wirt beeinflusst. Das Entwicklungsstadium (Larvenstadium oder Adultform) sowie der genetische Hintergrund (je nach Gelege unterschiedlich hohe Morbidität) scheinen die Empfänglichkeit und den Verlauf einer Ranavirusinfektion bei Tiger-Salamandern zu beeinflussen (BRUNNER et al., 2005).

In den zwei nachfolgend beschriebenen Infektionsversuchen wurden mit Ranaviren und verschiedenen Schildkrötenarten (*Trionyx sinensis*, *Terrapene ornata ornata*, *Trachemys scripta elegans*) die Henle-Koch-Postulate erfüllt und somit gezeigt, dass das verwendete Ranavirus als kausales Agens für die festgestellten Erkrankungen ursächlich ist.

Den ersten Infektionsversuch führten CHEN et al. (1999) durch. Gesunde junge chinesische Weichschildkröten (*Trionyx sinensis*) wurden intramuskulär oder durch Immersion in virushaltiges Wasser infiziert. Die Tiere erkrankten und zeigten die typische Symptome der „red neck disease“ wie hämorrhagische Hautveränderungen und Schwellung des Halses. Von den erkrankten Tieren konnte das inokulierte Virus re-isoliert werden. Die Virulenz des Virus wurde als moderat bezeichnet. Die Mortalität betrug in der Injektionsgruppe drei von sieben Tieren, in der Immersionsgruppe zwei von sieben Tieren und in der Kontrollgruppe null von sieben Tieren (CHEN et al., 1999).

Die zweite Infektionsstudie wurde von JOHNSON et al. (2007) vorgestellt. In einer Pilotstudie wurde zunächst die Eignung von Östlichen Schmuck-Dosenschildkröten (*Terrapene ornata ornata*) und Rotwangen-Schmuck-Schildkröten (*Trachemys scripta elegans*) als Infektionsmodell getestet. Jeweils ein Tier je Spezies wurde intramuskulär bzw. oral infiziert, während ein drittes als nicht infizierte Kontrolle diente. Jedes Tier wurde einzeln in einem Plastikbehälter gehalten. Die beiden intramuskulär infizierten Tiere erkrankten, und aus deren Nierenge-

webe konnte Ranavirus in *Terrapene Heart-Zellkultur* (TH-1) re-isoliert werden (JOHNSON et al., 2007).

Weil Tiere beider verwendeten Spezies erkrankten, erfolgte die nachfolgende größere Studie aus ökologischen Gründen mit zehn Rotwangen-Schmuck-Schildkröten. Vier Tiere wurden intramuskulär, vier weitere oral infiziert. Die verbliebenden zwei Tiere dienten als Kontrollgruppe (JOHNSON et al., 2007).

Drei der intramuskulär infizierten Tiere erkrankten schwer und wurden am 11., 13., bzw. 23. Tag p.i. eingeschläfert. Aus Rachen- und Kloakentupfern konnte bei der am 11. Tag p.i. eingeschläferten Schildkröte ab dem 7. Tag p.i. Ranavirusgenom mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden, bei der am 13. Tag p.i. eingeschläferten Schildkröte ab dem 5. Tag p.i. und bei der am 23. Tag p.i. eingeschläferten Schildkröte ab dem 9. Tag p.i. In den Organen (Zunge, Ösophagus, Magen, Darm, Leber, Milz und Niere) dieser drei Tiere ließ sich ebenfalls mit Hilfe der PCR Ranavirusgenom nachweisen. Aus dem Nierengewebe dieser drei Schildkröten konnte Ranavirus in *Terrapene Heart-Zellkultur* (TH-1) isoliert werden. Die vierte i.m. infizierte Schildkröte erkrankte nur leicht. Die Symptome (Augenausfluss und vermehrtes Sonnenbaden) verschwanden 25 Tage p.i. Es blieb aber weiterhin eine Anorexie bestehen. Aus Kloakentupfern konnte an Tag 2, 7, 19, 23 und 26 p.i. Ranavirusgenom mittels PCR nachgewiesen werden. An Tag 0, 5, 9, 12, 14, 16 und 21 p.i. wurde jedoch kein Ranavirusgenom in den Kloakentupfern nachgewiesen. In Rachentupfern ließ sich über den gesamten Untersuchungszeitraum kein Ranavirusgenom nachweisen. Bei der Sektion (Tag 28 p.i.) gelang aus den Organen (Zunge, Ösophagus, Magen, Darm, Leber, Milz und Niere) der Virusnachweis nicht (JOHNSON et al., 2007).

Drei der oral infizierten Schildkröten wurden ebenfalls anorektisch. Bei diesen Tieren ließ sich zwei Tage p.i. in Rachen- und bei zwei Tieren in Kloakentupfern Ranavirusgenom mittels PCR nachweisen. Aus dem Gewebe konnte bei der Sektion jedoch kein Virus isoliert werden. Das vierte oral infizierte Tier sowie die Kontrolltiere zeigten keine klinischen Symptome während des Beobachtungszeitraumes von vier Wochen. Bei diesen Tieren konnte weder aus Rachen- und Kloakentupfern noch nach an der anschließenden Sektion aus den Organen

Ranavirus in TH-1-Zellkultur isoliert oder mit einer PCR nachgewiesen werden (JOHNSON et al., 2007).

#### **2.4.4 Klinische Symptome**

In den unter Punkt 2.4.2 und 2.4.3 aufgeführten Berichten über Ranavirusbedingte Erkrankungen von Schildkröten werden zum Teil unterschiedliche Symptome beobachtet. Am häufigsten wird von einer Entzündung der Maulhöhle mit Erosionen und gelb-weißlichen Belägen berichtet (MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; MARSCHANG et al., 1999; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). Die Veränderungen in der Maulhöhle sind meist verbunden mit Lethargie (MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008) und Anorexie (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2007). Häufig war klarer, muköser bis purulenter Augenausfluss sowie Ausfluss aus Nase oder seltener Mund zu sehen (MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008), oft in Verbindung mit einer Konjunktivitis (MÜLLER et al., 1988; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). Mehrmals ließ sich eine Beteiligung der Haut von Kopf und Nacken erkennen, entweder beschrieben als subkutanes Ödem am Hals (MÜLLER et al., 1988; JOHNSON et al., 2008), Dermatitis (DE VOE et al., 2004) oder angeschwollener, hämorrhagischer Nacken (CHEN et al., 1999). Selten traten respiratorische Geräusche (DE VOE et al., 2004; BENETKA et al., 2007) oder Dehydrierung (WESTHOUSE et al., 1996; BENETKA et al., 2007) auf. In nur jeweils einem einzelnen Fall wird das Vorkommen eines kutanen oder subkutanen Abszesses (DE VOE et al., 2004; JOHNSON et al., 2008), Ohrabszesses (JOHNSON et al., 2008), Hauterythem (JOHNSON et al., 2007), Hyphema (JOHNSON et al., 2007) und Exophthalmus (JOHNSON et al., 2007) beschrieben.

#### 2.4.5 Makroskopische und mikroskopische Pathologie

In der Sektion präsentierte sich meist eine nekrotisierende Stomatitis (MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; MARSCHANG et al., 1999; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). In vielen Fällen war die Leber betroffen. Sie zeigte sich vergrößert und mit multifokalen Nekrosen und Petechien durchsetzt (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; CHEN et al., 1999; MARSCHANG et al., 1999; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007). Häufig war die Milz ebenfalls vergrößert und zeigte das Bild einer fibrinös- nekrotisierenden Splenitis (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; DE VOE et al., 2004; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). Eine hämorrhagisch-ödematöse bis multifokal nekrotisierende Gastritis und Enteritis zum Teil mit gelblichen Belägen war des Öfteren zu erkennen (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; MARSCHANG et al., 1999; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008) sowie eine hämorrhagische bis nekrotisierende Glomerulonephritis (MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). In mehreren Fällen waren durch eine nekrotisierend-ulzerierende Tracheitis (MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2008) und eine hyperämisch, ödematöse, nekrotisierende, zum Teil purulente Pneumonie (MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007) die Atmungsorgane mit beteiligt. Im Pankreas ließen sich Einzelzellnekrosen und Petechien erkennen (MÜLLER et al., 1988; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007). Nur in wenigen Fällen wird von einer Cystitis (ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007), einer multizentrisch fibrinösen Vaskulitis (JOHNSON et al., 2008), einer gallertigen, hämorrhagischen Meningitis (MÜLLER et al., 1988; JOHNSON et al., 2007) oder einer Nekrose des hämatopoietischen Gewebes (JOHNSON et al., 2008) berichtet.

In vielen Fällen konnten basophile, intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen nachgewiesen werden (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; MARSCHANG et al., 1999; ALLENDER et al., 2006; JOHN-

SON et al., 2007; JOHNSON et al., 2008). Die Einschlusskörperchen zeigten sich unterschiedlich groß und von ovaler bis runder Form. Ein Teil der Einschlusskörperchen drängte den Zellkern zum Rand der Zelle. Die Einschlusskörperchen wurden in vielen unterschiedlichen Gewebearten nachgewiesen. HELDSTAB und BESTETTI (1982) wiesen Einschlusskörperchen in Leber und Darm nach, MÜLLER et al. (1988) in Trachea, Magen, Pankreas, Dünndarm, Leber, Niere, Ependym und Plexus chorioideus, WESTHOUSE et al. (1996) in Pharynx, Ösophagus, Trachea und Lunge, MARSCHANG et al. (1999) in Zunge, Ösophagus, Trachea, Lunge, Leber und Darm, ALLENDER et al. (2006) in Leukozyten, Konjunktiven, Lunge und Leber, JOHNSON et al. (2007) in Milz und Leber sowie JOHNSON et al. (2008) in Zunge, Ösophagus, Trachea, Magen, Milz, endothelialen und hämatopoietischen Zellen.

Ein Teil der beschriebenen Symptome bzw. deren Ausprägung können durch Sekundärinfektionen bedingt sein. Es wurden verschiedene Bakterien, *Aeromonas* spp. (MÜLLER et al., 1988), *Pasteurella testudines* (MARSCHANG et al., 1999), *Corynebakterium* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus fecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, alpha-hämolyisierende *Staphylococcus* spp. (DE VOE et al., 2004), *Streptococcus* spp. (ALLENDER et al., 2006), *Staphylococcus* spp., *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. (BENETKA et al., 2007) nachgewiesen sowie die Pilze, *Absidia* spp. (DE VOE et al., 2004) und *Candida* spp. (BENETKA et al., 2007), Trematoden und Nematoden (MÜLLER et al., 1988; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2007) und Chelonid-Herpesvirus (BENETKA et al., 2007).

#### 2.4.6 Diagnose

Die Diagnose einer Infektion mit einem Virus des Genus *Ranavirus* kann durch den Virusnachweis sowohl aus Organproben als auch aus Tupferproben mittels Isolierung in Zellkulturen wie Terrapene Heart Zellen (MARSCHANG et al., 1999; JOHNSON et al., 2007), Grass Carp Ovary Zellen (Chen et al., 1999) und Toad Kidney Zellen (De Voe et al., 2004) oder *Ranavirus*-spezifischer PCR gestellt werden (MAO et al., 1997; MARSCHANG et al., 1999; HYATT et al., 2000; JUST et al., 2001; JOHNSON et al., 2008).

Pathohistologisch können die für ein Ranavirus typischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in einer großen Zahl verschiedener Gewebe, am offensichtlichsten in der Leber, das Vorhandensein eines Ranavirus anzeigen (OIE, 2007). Bei dieser Methode ist jedoch nur der gelungene Nachweis hinweisend, da nicht nach allen Ranavirusinfektionen Einschlusskörperchen gefunden werden (JOHNSON et al., 2008).

Eine zurückliegende Infektion kann mit Hilfe von Antikörpernachweisverfahren bestätigt werden. Bisher existiert nur eine einzige Methode zum Antikörpernachweis mittels ELISA in den USA (s. Punkt 2.4.6.3).

#### **2.4.6.1 Ranavirus-spezifische PCR**

Das ikosaedrale Kapsid der Iridoviren ist aus einem einzelnen Polypeptid, dem Major Capsid Protein (MCP), mit einem Molekulargewicht von 50 kDa aufgebaut (TIDONA et al., 1998). Das MCP-Gen hat eine Länge von 1.452 Basenpaaren und wird erst spät im Replikationszyklus abgelesen (ZHAO et al., 2007).

Von MAO et al. (1996) wurde das Major Capsid Protein (MCP) des Frog virus 3 sequenziert. MAO et al. (1997) entwickelten verschiedene Primer, die komplementär zu konservierten Regionen innerhalb des FV-3 MCP-Gens sind. Primer 1 und 2 ergeben ein Amplifikat in der vollen Länge des MCP-Gens. Primer 4 und 5 entsprechen Regionen innerhalb des MCP-Gens und liefern ein Amplifikat in der Länge von ca. 500 bp.

Diese Primer wurden in verschiedenen PCR-Protokollen eingesetzt, um die Anwesenheit von Ranaviren nachzuweisen (MAO et al., 1997; MARSCHANG et al., 1999; HYATT et al., 2000; JUST et al., 2001; JOHNSON et al., 2008).

#### **2.4.6.2 Neutralisationstest**

Bei Schildkröten wurde zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern noch kein Neutralisationstest eingesetzt. Daher lassen nur die bei Amphibien eingesetzten Neutralisationstests gewisse Rückschlüsse auf die vermutliche Eignung von Neutralisationstests zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern bei Schildkröten zu.



Der Einsatz von klassischen Neutralisationstests zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern wird bei Amphibien durch die Tatsache verhindert, dass polyklonale Antikörper von Amphibien gegen Ranaviren keine signifikante neutralisierende Aktivität zeigen (ZUPANOVIC et al., 1998a).

CHINCHAR et al. (1984) entwickelten monoklonale Maus-Antikörper gegen FV-3. In einem Plaque Neutralisationstest auf Fathead Minnow Zellen (FHM) sollte deren Fähigkeit, die virale Infektiosität zu mindern, gemessen werden. Dies war jedoch nur durch zusätzliche Zugabe von Kaninchen-anti-Maus-Antikörpern möglich, da sonst keine signifikante Reduktion der Infektiosität zu beobachten war.

Im Gegensatz zu der Aussage von ZUPANOVIC et al. (1998a) gelang MANIERO et al. (2006) der Nachweis von neutralisierenden Antikörpern im Blutserum von Glatten Krallenfroschen (*Xenopus laevis*). Die Frösche wurden durch zwei- bzw. dreimalige i.p. Injektion von FV-3 infiziert. Das gewonnene Serum wurde mit FV-3 inkubiert für eine Stunde auf Eis gelagert. Dabei entstanden gelatinöse Immunopräzipitate, die sich bei Erwärmung lösten. Das Serum-Virus-Gemisch wurde anschließend zu *Xenopus* Kidney A6 Zellen gegeben. Dabei zeigte sich, dass die Seren die Ausbildung zytopathischer Effekte zu einem gewissen Grad, jedoch nicht vollständig verhindern konnten. Bei der ebenfalls durchgeführten Titerbestimmung zeigte sich ein etwas niedrigerer Virustiter nach der Inkubation mit dem Serum.

#### **2.4.6.3 Enzyme-linked immunosorbent assay**

Amphibien, Fische und Reptilien können Antikörper gegen Ranaviren ausbilden. ZUPANOVIC et al. (1998b) entwickelten einen ELISA zum Nachweis von Antikörpern gegen Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) im Serum von Aga-Kröten (*Bufo marinus*). In einer Studie wurden 1.115 Seren von Aga-Kröten aus Australien und 240 Seren von Aga-Kröten aus Venezuela auf das Vorhandensein von EHNV-spezifischen Antikörpern untersucht. Mit 2,7 % positiven Seren der Kröten aus Australien und 8,3 % positiven Seren der Kröten aus Venezuela wurde eine niedrige Prävalenz festgestellt (ZUPANOVIC et al., 1998a). Ein ähnlicher ELISA kann zum Nachweis von Antikörpern gegen EHNV in

Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) eingesetzt werden (WHITTINGTON und REDDACLIFF, 1995).

JOHNSON et al. (2007) entwickelten einen indirekten ELISA zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern bei Schildkröten. Als Antigen wurde ein Ranavirus verwendet, welches aus einer gestorbenen Burma-Sternschildkröte (*Geochelone platynota*) isoliert worden war. Die Blutplasmaproben wurden in einer 1:100 Verdünnung aufgetragen. Als sekundärer Antikörper wurde ein biotiniertes Maus-anti-Schildkröten Immunglobulin verwendet. An Streptavidin gebundene Alkalische Phosphatase katalysierte den Farbumschlag des zugegebenen p-Nitrophenylphosphats. Jede Plasmaprobe wurde in einem Dreifachansatz (je ein Well mit uninfiziertem Zelllysate und je zwei Wells mit infiziertem Zelllysate) getestet. Aus der optischen Dichte (OD) der zwei Wells mit dem infizierten Zelllysate wurde der Mittelwert gebildet und durch die OD des Wells mit dem uninfizierten Zelllysate geteilt. Werte größer als zwei wurden als positiv bewertet.

Ca. 1.000 Seren von Georgia-Gopherschildkröten (*Gopherus polyphemus*) wurden mittels des oben genannten ELISA auf das Vorhandensein von Ranavirus-spezifischen Antikörpern untersucht. Dabei wurden 15 seropositive Schildkröten (1,5 %) gefunden (JOHNSON und JACOBSON, 2008).

#### **2.4.7 Differenzialdiagnosen**

Differenzialdiagnostisch sind vor allem die Herpesvirusinfektionen der Landschildkröten zu berücksichtigen. Mit Chelonid-Herpesvirus infizierte Schildkröten zeigen ähnliche klinische Symptome wie mit Ranavirus infizierte Schildkröten. Es können Speichelfluss, Nasenausfluss, Inappetenz und Beläge in der Maulhöhle auftreten. Herpesvirus-empfindliche Landschildkröten sterben meist nach einer Krankheitsdauer von wenigen Tagen. Herpesviren verursachen im Gegensatz zu Ranaviren intranukleäre Einschlusskörperchen in einer Vielzahl verschiedener Gewebe (SASSENBERG und ZWART, 2005).

### 2.4.8 Prophylaxe

Es gibt keine speziellen Angaben zur Prophylaxe einer Ranavirusinfektion. Ein Impfstoff steht nicht zur Verfügung.

Aus diesen Gründen sind allgemeine Prophylaxemaßnahmen, wie sie beispielsweise zur Prophylaxe von Herpesvirusinfektionen empfohlen werden, angezeigt. Die Optimierung der Haltungsbedingungen und die Bekämpfung von anderen Erkrankungen (z. B. Endoparasiten) haben einen positiven Einfluss auf das Immunsystem. Bei Neuzugängen wird eine mindestens achtwöchige Quarantäne empfohlen (SASSENBERG und ZWART, 2005). Während dieser Zeit sind Untersuchungen auf Ranavirus oder, wenn möglich, auf Antikörper gegen Ranavirus zu befürworten. Die Desinfektion kann mit Hilfe von rückstandsfreien, in ungiftige Substanzen zerfallenden Mitteln, wie Alkohol, Wasserstoffperoxid, Peressigsäure, Hypochlorite und Chlorhexidin, erfolgen (EISENBERG, 2003).

### 2.4.9 Therapie

Es ist keine effektive Therapie bekannt (SASSENBERG und ZWART, 2005; ALLENDER et al., 2006). Vorgeschlagen bzw. erprobt werden palliative Maßnahmen (supportive care) mit Flüssigkeitssubstitution, Vitamin- und Glukosegaben. Zur Therapie von Sekundärinfektionen können Antibiotika und bei gegebener Indikation auch Anthelmintika eingesetzt werden (MÜLLER et al., 1988; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007).

Die meisten erkrankten Tiere starben (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; MARSCHANG et al., 1999; CHEN et al., 1999; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2008) oder wurden eingeschläfert (WESTHOUSE et al., 1996; JOHNSON et al., 2008). Eine Südafrikanische Pantherschildkröte (*Geochelone pardalis pardalis*) wurde einen Monat lang mit nur mäßigem Erfolg mit Antibiotika und Flüssigkeitssubstitution behandelt und zeigte vier Monate nach Ende der Behandlung eine vollständige Besserung (BENETKA et al., 2007). JOHNSON et al. (2004) behandelten drei Burma-Sternschildkröten (*Geochelone platynota*) mit antimikrobiellen Wirkstoffen und Flüssigkeitssubsti-

tution. Zwei Schildkröten überlebten und zeigten sechs Monate nach den ersten Symptomen wieder ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

## **2.5 Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Methoden**

### **2.5.1 Enzyme-linked immunosorbent assay**

Der ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ist ein antikörpervermitteltes Verfahren zum Nachweis von Viren oder Antikörpern. Zur Bestimmung von Antikörpern wird gereinigtes Antigen an einen festen Träger (Mikrotiterplatte) gebunden. Das Serum mit eventuell enthaltenen Antikörpern wird hinzugegeben und kann mit dem an der Platte gebundenen Antigen einen Antigen-Antikörperkomplex bilden. Ein sekundärer Antikörper (Anti-Spezies-Antikörper) bindet an den schon gebundenen Antikörper. Der sekundäre Antikörper ist entweder direkt mit einem Enzym gekoppelt oder so verändert, dass in einem weiteren Schritt ein Enzym an ihn binden kann. Durch Zugabe von Substrat, welches durch das Enzym umgesetzt wird, lassen sich über den Farbumschlag positive Reaktionen erkennen (BÜTTNER, 2002).

### **2.5.2 Polymerasekettenreaktion**

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode zum Nachweis von genomischem Material. Die DNA wird durch Erhitzen in Einzelstränge überführt. Erregerspezifische Oligonucleotide (Primer) lagern sich beim Abkühlen an den DNA-Strang an und bieten einer thermostabilen DNA-Polymerase die Möglichkeit, mit Hilfe von Zugabe der vier Nucleotidtriphosphate eine komplementäre DNA-Sequenz zu synthetisieren. Die Erhitzungs- und Abkühlungsperioden lassen sich in Thermocyclern beliebig oft durchführen, wobei es zu einer logarithmischen Amplifikation virusspezifischer DNA-Stränge kommt. Diese können dann mit Hilfe der Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden (BÜTTNER, 2002).

### 2.5.3 Restriktionsenzymanalyse

Restriktionsendonukleasen erkennen im Allgemeinen spezielle Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren innerhalb doppelsträngiger DNA und spalten die DNA. Es gibt drei verschiedene Typen von Restriktionsenzymen. Meist werden Restriktionsenzyme des Typs II genutzt, da sie als einzige reproduzierbare Ergebnisse liefern. Typ II Restriktionsenzyme erkennen eine Zielsequenz und schneiden an genau definierter Stelle (SMITH und NATHANS, 1973; ROBERTS et al., 2003). So entstehen verschieden große DNA-Fragmente, die ein spezifisches Bandenmuster ergeben. Anhand des Bandenmusters lassen Verwandtschaftsverhältnisse auf molekularbiologischer Ebene untersuchen.

### 2.5.4 Sequenzanalyse

Es gibt verschiedene Methoden zur Sequenzierung von DNA. In diesem Fall wurde die Didesoxymethode von SANGER et al. (1977) angewandt. Bei dieser Methode wird in der Sequenzierungs-PCR zusätzlich zu den Nukleosidtriphosphaten eine geringe Menge an Didesoxynukleosidtriphosphaten angeboten. Ein Didesoxynukleosidtriphosphat wird ebenso wie ein Nukleosidtriphosphat in die DNA eingebaut. Durch die fehlende Hydroxylgruppe am 3'-Kohlenstoffatom kann jedoch kein weiteres Nukleotid binden, und es kommt zu einem Abbruch der DNA-Synthese. Die vier verschiedenen Didesoxynukleosidtriphosphate sind jedes spezifisch mit einem unterschiedlichen Farbstoff gekoppelt (sogenannte Fluorophore). Die unterschiedlich langen DNA-Ketten werden elektrophoretisch in einer Kapillare ihrer Länge nach aufgetrennt. Die detektierte Fluoreszenz der verschiedenen Farbstoffe entspricht dabei der Nukleotidbase, so dass die Sequenz der DNA ermittelt werden kann. Im optimalen Fall können nach einer einzigen Sequenzierungsreaktion über 1.000 Basen gelesen werden (HIRSCHKAUFFMANN und SCHWEIGER, 2006; PASSARGE und KOHLHASE, 2006; EITINGER, 2007).

## 2.6 Fragestellungen der eigenen Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit ist es, die spärlichen Kenntnisse über Infektionen mit Ranaviren bei Schildkröten zu vergrößern. Aus mehreren Beständen mit durch Ranavirus erkrankten Schildkröten werden Viren isoliert. Diese Viren sowie zum Vergleich Ranaviren von früheren Isolationen werden zunächst in Zellkultur angezüchtet, aufgereinigt und vermehrt. Mit Hilfe von Chloroformtest und 5-Iod-2-Desoxy-Uridin-Test sollen die Viren als behüllte, DNA-haltige Viren identifiziert werden. Anhand einer Ranavirus-spezifischen PCR sollen die Viren als Ranaviren bestätigt werden. Da in der Literatur verschiedene Methoden zum Durchführen der Ranavirus-spezifischen PCR zu finden sind, ist das Finden der optimalen Bedingungen für die Ranavirus-spezifische PCR ein weiteres Ziel.

Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit stellt der Versuch dar, ein geeignetes Verfahren zum Nachweis von Antikörpern zu etablieren. Die Viren werden auf hämagglutinierende Eigenschaften getestet, so dass im positiven Fall die Möglichkeit eines Hämagglutinationshemmungstestes besteht. Es wird versucht, einen Neutralisationstest sowie einen ELISA zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern zu entwickeln. Seren, die von unverdächtigen Schildkröten zur Herpesdiagnostik eingesandt wurden, sowie Seren von Schildkröten aus Ranavirus-verdächtigen Beständen sollen anhand von Serumneutralisationstest und ELISA auf die Anwesenheit von Antikörpern untersucht werden. Dabei sollen verschiedene Virusisolate als Antigene verwendet werden, um festzustellen, ob antigenetische Unterschiede zwischen den Isolaten vorhanden sind.

Des Weiteren werden Untersuchungen zur Temperatursensitivität und Speziespezifität durchgeführt. Dazu werden unterschiedliche Zellkulturen mit verschiedenen Isolaten infiziert und bei zwei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert. Zur Klärung der Verwandtschaftsverhältnisse der verschiedenen Ranavirusisolate werden die Restriktionsenzymanalyse und die Sequenzanalyse eingesetzt. Außerdem wird ein Bestand mit an Ranavirus erkrankten Tieren genauer untersucht, um Erkenntnisse über den Verlauf der Erkrankung, die Ausscheidung von Ranaviren und die Entwicklung der Antikörpertiter zu erhalten.

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 Bezeichnung der Schildkröten-Spezies

Bei der Bezeichnung der in dieser Arbeit genannten Schildkröten-Spezies wurde sich an der Checklist of Chelonians of the World von FRITZ und HAVES (2007) orientiert. Die im Literaturteil aus den entsprechenden Publikationen übernommenen Speziesbezeichnungen *Emydura krefftii*, *Trionyx sinensis* und *Geochelone pardalis pardalis* heißen demnach korrekterweise *Emydura macquari krefftii*, *Pelodiscus sinensis* und *Stigmochelys pardalis pardalis*.

#### 3.2 Zellkulturen

Terrapene Heart Zellen (TH-1, subline B1, ECACC No. 90102528). Erhalten von der European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK

(Russell's) Viper Heart Zellen (VH2; ATCC-CCL-140). Erhalten von der American Type Culture Collection, Rockville, USA

Schaf Thymus Zellen (SFT-R). Erhalten von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

Maus Neuroblastom Zellen (Na 42/13; Sublinie von Neuro 2A). Erhalten von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

Madin-Darby Bovine Kidney Zellen (MDBK). Erhalten von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

Buffalo Green Monkey Kidney Zellen (BGM). Erhalten von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

Baby Hamster Kidney Zellen (BHK 21/C13). Erhalten von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

Rind Ösopharynxgewebe Zellen (KOP-R). Erhalten von der Zellbank für Zelllinien in der Veterinärmedizin, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems

### 3.3 Materialien für die Zellkulturen

Phosphate Buffered Saline solution nach Dulbecco (PBS)

16,0 g	Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
0,4 g	Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)
2,3 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
0,4 g	Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
2,0 g	Glukose (Merck, Darmstadt)
40,0 ml	Kanamycin 5 mg/ml (Biochrom, Berlin)

gelöst in 2 l Aqua bidest., pH 7,2-7,43, steril filtriert (1,2 µm Cellulose Acetat Filter, 0,45 µm Cellulose Acetat Filter, Glasfaserfilter und 0,2 µm Cellulose Acetat Filter)

PBS-Versen-Lösung

16,0 g	Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
0,4 g	Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)
2,3 g	Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
0,4 g	Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
0,4 g	Titriplex III (Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat) (Merck, Darmstadt)
40,0 ml	Kanamycin 5 mg/ml (Biochrom, Berlin)

gelöst in 2 l Aqua bidest., pH 7,2-7,43, steril filtriert (1,2 µm Cellulose Acetat Filter, 0,45 µm Cellulose Acetat Filter, Glasfaserfilter und 0,2 µm Cellulose Acetat Filter)



---

### Trypsin-Lösung

- 8,00 g/l Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)
  - 0,20 g/l Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)
  - 0,20 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
  - 1,15 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)
  - 1,00 g/l Glukose (Merck, Darmstadt)
  - 10,00 g/l Trypsin (1:250) (Serva, Heidelberg)
  - 20,00 ml/l Kanamycin 5 mg/ml (Biochrom, Berlin)
- gelöst in Aqua bidest, steril filtriert (1,2 µm Cellulose Acetat Filter, 0,45 µm Cellulose Acetat Filter, Glasfaserfilter und 0,2 µm Cellulose Acetat Filter)

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

- 19,38 g MEM-Earle (Biochrom, Berlin)
  - 1,70 g Natriumhydrogencarbonat (Merck, Darmstadt)
  - 20,00 ml Non essential amino acids (Biochrom, Berlin)
- gelöst in 2 l Aqua bidest., pH 7,2-7,4, steril filtriert (1,2 µm Cellulose Acetat Filter, 0,45 µm Cellulose Acetat Filter, Glasfaserfilter und 0,2 µm Cellulose Acetat Filter)

Fetal Bovine Serum (Biochrom, Berlin)

Gentamycin 10 mg/ml (Biochrom, Berlin)

Amphotericin B 250 µl/ml (Biochrom, Berlin)

Partricin 50 µg/ml (Biochrom, Berlin)

### Gewebekulturflaschen

- 550 ml, 175 cm<sup>2</sup> (greiner bio-one, Frickenhausen)
- 50 ml, 25 cm<sup>2</sup> (greiner bio-one, Frickenhausen)

96 Well Cell Culture Plate, Cellstar<sup>®</sup>, sterile, F-bottom, with lid (greiner bio-one, Frickenhausen)

24 Well Cell Culture Plate, Cellstar<sup>®</sup>, sterile, with lid (greiner bio-one, Frickenhausen)

Mikroskop, Telaval 31 (Zeiss, Jena)

CO<sub>2</sub>-Begasungsbrutschränke (28 °C bzw. 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) BB 6220 (Heraeus, Hanau)

Brutschrank (28 °C) BB 6060 (Heraeus, Hanau)

Brutschrank (37 °C) B 6760 (Heraeus, Hanau)

Sicherheitswerkbänke

Herasafe (Heraeus, Hanau)

Lamin Air HBB 2448 (Heraeus, Hanau)

Disposable Cell Scraper (Costar, Cambridge, USA)

Ultraschallbad, Branson 5200 (Branson, Danbury, USA)

Wasserbad, Typ 1004 (GFL, Burgwedel)

### **3.4 Materialien für den ELISA**

Bradford Test:

Coomasie<sup>®</sup> Brilliant Blau G 250 (Serva, Heidelberg)

Ethanol 96 % (Merck, Darmstadt)

o-Phosphorsäure 85 % (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Spectrophotometer UV1, UV-VIS Zweistrahl (Thermo Scientific, Karlsruhe)

Bovine Serum Albumin, non-acetylated (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Phosphate Buffered Saline solution (PBS<sub>E</sub>)

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

0,20 g/l Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

1,44 g/l Dinatriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

0,24 g/l Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

gelöst in Aqua bidest., steril filtriert (1,2 µm Cellulose Acetat Filter, 0,45 µm Cellulose Acetat Filter, Glasfaserfilter und 0,2 µm Cellulose Acetat Filter)

## PBS/A

8,0 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)

0,2 g Natriumazid (Sigma-Aldrich, Steinheim)

in 1 l PBS<sub>E</sub> lösen

## Waschpuffer

0,5 ml Tween 20 (Serva, Heidelberg)

in 1 l PBS/A lösen

## Blocking Buffer ohne Tween

50 g Magermilchpulver (Humana Milchwerke, Herford)

in 1 l PBS/A lösen

## Blocking Buffer

50 g Magermilchpulver (Humana Milchwerke, Herford)

in 1 l Waschpuffer lösen

sekundärer Antikörper, biotinlierter HL1546 (5,31 mg/ml) Erhalten von Prof. M. B. Brown, University of Florida, Gainesville, USA

Streptavidin-Alkaline Phosphatase from *Streptomyces avidinii*, lyophilized powder, 700-1.400 DEA units/mg protein (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Sigma Fast™ p-Nitrophenyl Phosphat Tabletten (Sigma-Aldrich, Steinheim)

96 Well PS Microplatte, nicht steril, Nr. 655101, (greiner bio-one, Frickenhausen)

Natriumhydroxid Plättchen (Merck, Darmstadt)

MRX-Microplate Reader (Dynatech Laboratories, Berlin)

Tris Buffered Saline solution (TBS)

12,1 g Tris (Merck, Darmstadt)

5,8 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)

gelöst in 1 l Aqua bidest., steril filtriert (1,2 µm Cellulose Acetat Filter, 0,45 µm Cellulose Acetat Filter, Glasfaserfilter und 0,2 µm Cellulose Acetat Filter)

TBS-Waschpuffer

0,5 ml Tween 20 (Serva, Heidelberg)

in 1 l TBS lösen

TBS-Blocking Buffer

50 g Magermilchpulver (Humana Milchwerke, Herford)

in 1 l TBS-Waschpuffer lösen

### **3.5 Materialien für die DNA-Isolierung**

DNA-Extraktionskit NucleoSpin® Tissue (Machery-Nagel, Düren). Komponenten:

NucleoSpin® Tissue Säulen

2 ml Zentrifugen-Auffanggefäße

Proteinase K (20 mg/ml)

Lösung T1 (Lysispuffer)

Lösung B3 (Bindungspuffer)

Lösung BW (Waschpuffer)

Lösung B5 (Waschpuffer)

Lösung BE (Elutionspuffer 0,5 mM TRIS/HCl, pH = 8,5)

1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)

Micro Amp, Reaction Tube with Cap, 0,2 ml (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Ethanol (96 %) (Merck, Darmstadt)

Wasserbad, Typ 1002 (GFL, Burgwedel)

Blockthermostat, HBS 130 (Scientific Plastics, Berinsfield, UK)

### 3.6 Materialien für den PCR-Ansatz

Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)

dATP, dTTP, dCTP und dGTP, 10 µM/100 µl (Sigma, Steinheim)

Gebrauchslösung: 25 µl je dNTP auf 900 µl Aqua bidest.

10x PCR-Reaktionspuffer (Quiagen, Hilden)

Taq DNA Polymerase (5 Units/µl, Quiagen, Hilden)

Magnesiumchlorid (25 mM, Quiagen, Hilden)

Q-Solution, 5x (Quiagen, Hilden)

Primer

Rana MCP 4 # 42325 (0,1 nmol/µl) FV-3-MCP 4 (5'-GAC TTG GCC ACT TAT GAC-3') Tm 54 °C (Biometra, Göttingen)

Rana MCP 5 # 42324 (0,1 nmol/µl) FV-3-MCP 5 (5'-GTC TCT GCA GAA GAA GAA-3') Tm 52 °C (Biometra, Göttingen)

Thermocycler, PTC-200 (Biozym, Hess. Oldendorf)

### 3.7 Materialien für die Gelelektrophorese

TA-Laufpuffer (50 x konzentriert)

242,0 g/l Tris (Merck, Darmstadt)

57,1 ml/l Eisessig (Merck, Darmstadt)

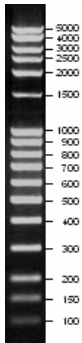
100,0 ml/l 0,5 M EDTA (Sigma, Steinheim)

gelöst in Aqua dest., Gebrauchslösung: 200 ml TA-Laufpuffer (50x konzentriert)  
auf 10 l Aqua bidest.

Biozym LE Agarose, >500 bp (Biozym, Hess. Oldendorf)

Mikrowelle, DAEWOO KOR-63Y5G (Daewoo, Butzbach)

100 bp-DNA-Leiter ext. von 100-5.000 bp (Molekularbiologisches und Biochemisches Labor Dr. Bartling, Bielefeld)



**Abbildung 2:** 100 bp-DNA-Leiter ext.

Auftragepuffer

2,5 g/l Bromphenolblau (Serva, Heidelberg)

2,5 g/l Xylencyanol (Serva, Heidelberg)

400,0 g/l Saccharose (Serva, Heidelberg)

gelöst in Aqua bidest.

Gelelektrophoresekammer, SUB-CELL® GT (Bio-Rad, München)

Spannungsgeräte

PS 500 XT (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)

POWER PAC 200 (Bio-Rad, München)

Ethidiumbromidlösung

5 µl Ethidiumbromid (Serva, Heidelberg)

in 100 ml Laufpuffer lösen

Dokumentations- und Analysesystem T 2201 (Sigma-Aldrich, Steinheim)

### **3.8 Materialien für die Restriktionsenzymanalyse**

Restriktionsenzyme

EcoRI und Puffer H (Promega, Madison, USA)

HindIII und Puffer E (Promega, Madison, USA)

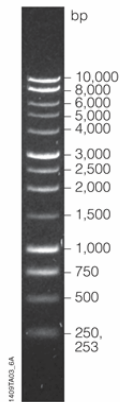
XbaI und Puffer D (Promega, Madison, USA)

KpnI und Puffer J (Promega, Madison, USA)

MspI und Puffer B (Promega, Madison, USA)

### DNA-Größenmarker

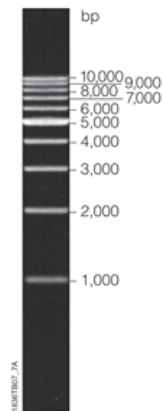
1kb DNA Ladder (Promega, Madison, USA)



0.7% agarose

**Abbildung 3:** 1kb-DNA-Leiter

1kb DNA Step Ladder (Promega, Madison, USA)

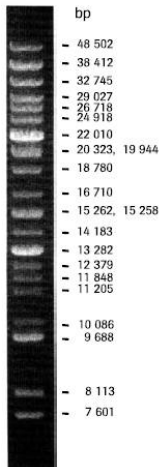


0.7% agarose

**Abbildung 4:** 1kb DNA-Stufen-Leiter



DNA molecular weight marker XV (Roche Diagnostics, Mannheim)



**Abbildung 5:** Marker XV

### 3.9 Materialien für die Sequenzierung

QIAquick® PCR Purifikation Kit (Qiagen, Hilden). Komponenten:

QIAquick® Spin Säulen

2 ml Auffanggefäße

Puffer PB

Puffer PE

Puffer EB

Bio Photometer (Eppendorf, Hamburg)

UVette® 220-1.600 nm, disposable single sealed cuvettes, 50-2.000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Premix, Big Dye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing RR-100 (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Sequencing Buffer, 5x (Applied Biosystems, Foster City, USA)

DyeEx<sup>®</sup> 2.0 Spin Kit (Qiagen, Hilden). Komponenten:

DyeEx<sup>®</sup> Spin Säulen

2 ml Auffanggefäße

Li Chrosolv, Wasser für Chromatographie (Merck, Darmstadt)

EDTA Puffer, 10x (Applied Biosystems, Foster City, USA)

POP-6, Performance Optimized Polymer 6 (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Proben-Tray für 48 Proben (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Glasspritze 1 ml (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Glasröhrchen mit Deckel, 4 ml Buffer Vials (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Septa for 0,5 ml Sample Tubes (Applied Biosystems, Foster City, USA)

0,5 ml Reagiergefäße ohne Deckel (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Kapillare, 5-47 cm x 50 µm Capillaries (Applied Biosystems, Foster City, USA)

KimWipes, Präzisionswischtücher (Kimberly-Clark, Reigate, UK)

Sequenzierer, Abi Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, USA)

---

310 Data Collection-Software (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Sequencing Analysis 5.3.1-Software (Applied Biosystems, Foster City, USA)

### 3.10 Sonstige Materialien

Alseversche Lösung

20,50 g Glukose (Merck, Darmstadt)

7,99 g Natriumzitat (Merck, Darmstadt)

4,20 g Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)

0,55 g Zitronensäure-Monohydrat (Merck, Darmstadt)

gelöst in 1 l Aqua bidest., filtriert (0,2 µm Cellulose Acetat Filter)

Autoklav, Technoklav 50 (Integra Biosciences, Fernwald)

Kühlschrank und Tiefkühlschrank (Liebherr, Ochsenhausen)

Gefriertruhe (GFL, Burgwedel)

Pipetten

1-10 µl, 10-100 µl und 200-1000 µl (Eppendorf, Hamburg)

Pipettenspitzen, Biosphere<sup>®</sup> Filter Tips (Sarstedt, Nürnberg)

Präzisionswaage, BDBC 200 (Kern GJ, Balingen-Frommern)

Filtereinheiten

FP 30/0,2 CA-S 0,2 µm (Whatman, Dassel)

Minisart 16555, 0,45 µm (Biofiltronic, Nörten-Hardenberg)

Zellulose Acetat Filter

1,2 µm, 0,45 µm und 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

Glasfaserfilter (Sartorius Stedim Biotech, Göttingen)

Transferpipette, 2,5 ml (Sarstedt, Nümbrecht)

Pipetboy acu (Integra Biosciences, Fernwald)

96 Well Microplate, PS, V-Boden (greiner bio-one, Frickenhausen)

pH Meter, 766, Calimatic (Knick Elektronische Messgeräte, Berlin)

Chloroform p. a. (Merck, Darmstadt)

Schüttler, Typ VX2V (IKA, Staufen)

5-Jodo-2-deoxyuridine (99 %) (Sigma-Aldrich, Steinheim)

Zentrifugen

Varifuge (3.2 RS , 3.0 RS) (Kendro, Hanau)

Biofuge (primo, 15) (Kendro, Hanau)

XL-70 Ultrazentrifuge (Beckman Coulter, Krefeld)

PP-Röhrchen, steril, 12 ml (greiner bio-one, Frickenhausen)

PP-Röhrchen, steril, 50 ml mit Stehrand (greiner bio-one, Frickenhausen)

Mehrkanalpipetten

5-50  $\mu$ l und 25-200  $\mu$ l (SLT Labinstruments, Crailsheim)

### 3.11 Virusisolate

**Tabelle 4:** Angaben zur Isolierung und Herkunft der verwendeten Ranavirusisolate

Bezeichnung des Isolats	Spezies, aus der das Isolat stammt	Isolierung aus	Herkunft	Jahr der Isolierung
FV-3	<i>Rana pipiens</i>	Niere (Adenokarzinom)	Dr. R. E. Marschang	1965
882/96	<i>Testudo kleinmanni</i>	Zunge	CVUA OWL	1996
1834/04	<i>Tylosotriton kweichowensis</i>	Leber	CVUA OWL	2004
4152/07	<i>Testudo hermanni</i>	Zunge	CVUA OWL	2007
5187/07	<i>Testudo hermanni</i>	Niere	CVUA OWL	2007
5810/07	<i>Testudo hermanni</i>	Lunge	CVUA OWL	2007
6172/07	<i>Testudo hermanni</i>	Leber	CVUA OWL	2007
354/08	<i>Testudo hermanni</i>	Milz	CVUA OWL	2008
CU10/08	<i>Testudo hermanni</i>	Zunge	CVUA OWL	2008
CU60/09	<i>Testudo marginata</i>	Lunge	CVUA OWL	2009

CVUA OWL: Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe

Das Frog virus 3 (**FV-3**) ist die Typspezies des Genus *Ranavirus* der Familie *Iridoviridae* (CHINCHAR et al., 2005). Das Virus wurde ursprünglich von GRANOFF et al. (1965) aus einem Leopardfrosch (*Rana pipiens*) mit renalem Adenokarzinom isoliert. Das Isolat wurde freundlicherweise von Frau Dr. Rachel E. Marschang, Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim, Stuttgart zur Verfügung gestellt. Frau Dr. Marschang hatte das FV-3 von Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Winfried Ahne, Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten, Ludwig-Maximilians-Universität, München erhalten.

Alle anderen Virusisolate wurden im Chemischen und Veterinäruntersuchungsamt Ostwestfalen-Lippe aus Organproben isoliert. Die Viren 882/96, 1834/04, 4152/07, 5187/07, 5810/07, 6172/07 und 354/08 wurden schon vor Beginn meiner Arbeit isoliert und wie im CVUA OWL üblich mit einer über das Jahr fortlaufenden Nummer versehen. Die Nummer hinter dem Schrägstrich gibt das Jahr

an, in dem das Virus isoliert wurde. Die beiden Viren CU10/08 und CU60/09 wurden von mir im Verlauf meiner Arbeit isoliert und zur Unterscheidung von den Routineproben mit den Buchstaben CU, einer fortlaufenden Nummer sowie der Jahreszahl gekennzeichnet. In den nachfolgenden Tabellen und Abbildungen wurde aufgrund der besseren Darstellbarkeit auf die Angabe der Jahreszahl verzichtet.

**Virus 882/96** wurde aus einem *Testudo kleinmanni*-Weibchen isoliert. Das Weibchen stammt aus einem Aquaristik- und Terraristik-Geschäft (Bestand O). Es zeigte im August 1996 Schnupfen und geschwollene Augenlider. Trotz Behandlung starb es nach einer Krankheitsdauer von einer Woche. In der Sektion zeigte sich die Schildkröte in einem guten Ernährungszustand. In der Maulhöhle waren Schleim und eine stark gerötete Rachen- und Zungenschleimhaut zu sehen. Der Dickdarm enthielt Kot. Die Leber war etwas geschwollen und marmoriert. Die Milz war ebenfalls geschwollen und mit hellen Herden durchsetzt. In der Harnblase war Harngrieß zu finden. Am Ovar befanden sich teils angebildete, teils atretische Follikel.

In der histologischen Untersuchung zeigte sich das Epithel der Zunge stark autolytisch. Vereinzelt waren intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen zu erkennen. Die Milz war hyperämisch mit Fibrinexsudation und Nekroseherden. Der Darm war autolytisch.

Aus Herz, Leber und Niere wurden *Escherichia coli*, *Pseudomonas mesophilica* und *Staphylococcus* spp. isoliert.

Eine zweite *Testudo kleinmanni*, die sich im selben Terrarium befunden hatte, hatte ebenfalls Schnupfen und Inappetenz gezeigt. Sie war jedoch genesen.

**Virus 1834/04** stammt von einem Massensterben im Jahr 2004 von nach Belgien und den Niederlanden importierten Kweichow Krokodilmolchen (*Tylosotriton kweichowensis*) (PASMANS et al., 2008). Im Juni 2004 waren 100 *Tylosotriton kweichowensis* von einer belgischen Tierhandlung aus China importiert worden. In der Tierhandlung erschienen alle Molche gesund und in Zuchtform. Ein klei-

ner Teil der Molche zeigte limitierte Hautulzerationen. Innerhalb von zwei Wochen wurden alle Molche an verschiedene Privatpersonen verkauft.

Im Verlauf der nächsten zwei Monate starben 38 von 39 bei drei verschiedenen Haltern gehaltenen Molchen. Bei den Molchen waren Hautulzerationen, Anorexie, Apathie und gelegentlich Ödeme aufgefallen. Bei den ersten gestorbenen Molchen sowie bei Kotuntersuchungen wurde eine massive Infektion mit dem Lungennematoden *Rhabdias tokyoensis* festgestellt. Durch Gabe von Fenbendazol wurde die Infektion mit *Rhabdias tokyoensis* bekämpft. Trotzdem starben weiterhin Molche. Von den drei verschiedenen Besitzern wurde je ein Molch erhalten und virologisch untersucht. Dazu wurde Organmaterial auf VH2-Zellen inokuliert und ein Iridovirus isoliert. Dieses Ergebnis wurde in der PCR nach MAO et al. (1997) bestätigt. Eine Sequenzierung des entstandenen Amplikons zeigte eine 99,8 % Identität zu FV-3.

Es wurde ein Infektionsversuch mit dem erhaltenen Isolat in Axolotln (*Ambystoma mexicanum*) durchgeführt, um den Zusammenhang zwischen den klinischen Symptomen und dem Vorhandensein der Ranaviren zu klären. Drei Axolotl wurden intracoelomical mit Virussuspension infiziert. Die drei Axolotl zeigten drei bis neun Tage nach der Infektion Inappetenz und ein Axolotl wies 9 bis 21 Tage p.i. blasse Kiemen auf. Danach konnten keine weiteren Symptome festgestellt werden. Bei der Sektion neun Wochen p.i. konnte weder auf Zellkultur noch mit Hilfe der PCR Ranavirus nachgewiesen werden.

Für die eigenen Untersuchungen wurde ein Virusisolat verwendet, welches aus Lebergewebe eines der gestorbenen *Tylotriton kweichowensis* isoliert wurde.

**Virus 4152/07** wurde aus einem *Testudo hermanni*-Weibchen „Ayla“ isoliert. Dieses Weibchen stammt aus einer *Testudo hermanni*-Gruppe (Bestand M), welche aus sechs adulten Weibchen, einem adulten Männchen und vier Jungtieren (einjähriger Nachwuchs des betroffenen Weibchens) bestand. Diese Gruppe wurde im Sommer auf einer ca. 25 m<sup>2</sup> großen, mit Bäumen, Sträuchern und Kräutern bewachsenen Freiland-Wiesenfläche gehalten. Diese Fläche war mit einer Wasserstelle und einem hölzernen Schutzhaus ausgestattet. In der Übergangszeit und während Schlechtwetterperioden wurden die Schildkröten in

ein ausreichend großes und artgerecht eingerichtetes Terrarium gesetzt. Die Hibernation erfolgte regelmäßig in einer Laubkiste in einer frostfreien Garage. Bei den vier Jungtieren wurde die Hibernation ausgesetzt. Das Futter war in seiner Zusammensetzung rein vegetarisch sowie mit zusätzlich Sepiaschulpe ad libitum angereichert. Alle Schildkröten dieser Gruppe wurden in ein- bis zweiwöchigen Abstand lauwarm gebadet. Es wurden regelmäßig parasitologische Kotuntersuchungen durchgeführt und bei positiven Befunden eine antiparasitäre Therapie vorgenommen.

Die gesamte Gruppe wurde im Sommer 2007 für vier Wochen zur Betreuung während der Urlaubszeit an Dritte abgegeben. Dort entwickelte ein erst kurz zuvor zugekauftes Weibchen eine Atemwegserkrankung. Dieses Weibchen hatte zum Zeitpunkt des Kaufs keine sichtbaren Symptome gezeigt und war deshalb in die bestehende gesunde Gruppe eingegliedert worden. Zwei Wochen nach dem Kauf zeigte das Weibchen Anorexie, ein häufig aufgerissenes Maul und starb nach einer Krankheitsdauer von einer Woche.

Sieben Wochen (21.7.2007) nach dem Zukauf wurde ein *Testudo hermanni*-Weibchen dieser Gruppe, „Ayla“, beim Haustierarzt vorgestellt, weil sie seit der Rückkehr aus der Urlaubsbetreuung nicht mehr fraß und trank. Des Weiteren war aufgefallen, dass sie weniger aktiv war und tränende Augen hatte. „Ayla“ war drei Jahre zuvor als adultes Tier in den Bestand M gekommen. Da sie ein Fundtier war, ließ sich ihr Alter nicht genau bestimmen.

Dem Haustierarzt stellte sich „Ayla“ als gut gewachsenes und gut entwickeltes Weibchen mit einem Gewicht von 1.450 g dar. Sie war aber in einem reduzierten Ernährungszustand, mittelgradig dehydriert, schwach, teilnahmslos und machte einen moribunden Eindruck. Eine beidseitige Konjunktivitis mit Tränenfluss, seröser Nasenausfluss und deutliche zischend-pfeifende bis knackende inspiratorische Atemgeräusche waren feststellbar. In der Maulhöhle zeigten sich eine fleischig-blutrote Zunge und zäher weißlicher Schleim sowie weißliche Beläge auf der Rachenschleimhaut. Die Beläge ließen sich schwer bis gar nicht ablösen. Beim Versuch zum Ablösen der Beläge kam es leicht zu Blutungen. Ein beidseitig durchgeführter Fluoreszeintest zum Ausschluss von Corneaverletzungen war negativ. Bei der koprologischen Untersuchung wurde ein massi-



ver Gehalt an Oxyureneiern nachgewiesen. Aus einem Rachentupfer wurden mittels PCR (VAN DEVANTER et al., 1996) keine Herpesviren detektiert. „Ayla“ wurde stationär aufgenommen und täglich mit Enrofloxacin (10 mg/kg KGW, ab dem 2. Tag 5 mg/kg KGW) und Oxytetracyclin (10 mg/kg KGW) sowie einmalig mit dem Sekretolytikum Acetylcystein behandelt. Zur Rehydratation bekam sie Ca/Ringer-Infusionen (1-3 % des KGW). Nach fünf Tagen starb sie und wurde zur Sektion ins CVUA OWL geschickt.

Das Tier zeigte sich bei der Sektion in einem reduzierten Ernährungszustand. Das Epithel der Zunge fehlte weitgehend. Am Rand der Zunge waren Auflagerungen zu erkennen. Die Milz zeigte sich deutlich vergrößert. Magen und Dünndarm waren leer. In Blind- und Dickdarm waren pflanzlicher Kot und ein hochgradiger Befall mit Oxyuren spp. zu sehen.

Histologisch waren in der Zunge zahlreiche Sarkozysten zu sehen. Die Leber zeigte sich autolytisch mit Nekroseherden. In der Niere waren intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen zu erkennen. Herz, Milz und Dickdarm waren ebenfalls autolytisch.

Mittels TH-1-Zellkultur wurde ein Ranavirus aus Organgewebe isoliert. Für die eigenen Untersuchungen wurde ein Virusisolat aus Zungengewebe verwendet.

**Virus 5187/07** stammt von einer weiblichen *Testudo hermanni* aus Bestand L. Die schwerkranke Schildkröte wurde im September 2007 ohne Vorbericht zur Untersuchung und ggf. Sektion in das CVUA OWL eingeschickt. Die Schildkröte zeigte einen reduzierten Ernährungszustand. Die Augenlider waren geschlossen und verklebt. In der Maulhöhle waren gelbe Beläge und eine gerötete Schleimhaut zu sehen. Magen und Blinddarm waren leer. Im Dickdarm war ein graugrüner Inhalt zu finden. Die Dickdarmschleimhaut war hochgradig ödematisiert. Die Geschlechtsorgane waren inaktiv.

Bei der histologischen Untersuchung zeigte sich das Zungenepithel zum größten Teil abgelöst. Heterophile Granulozyten waren in großer Zahl in den Belägen und auch in der Submukosa der Zunge zu finden. Die Lunge wies ein ödematisiertes Interstitium und eine geringgradige Heterophilie auf. Auch in den Lebergefäßen war eine geringgradige Einwanderung von heterophilen Granulo-

zyten zu sehen. Der Dickdarm wies ein hochgradiges, submuköses Ödem mit Einwanderung von heterophilen Granulozyten und Nekrosen der Schleimhaut mit starker heterophiler Infiltration neben gesunden Bezirken auf.

In der parasitologischen Untersuchung fiel ein hochgradiger Befall mit Oxyuren spp. auf. Durch die bakteriologische Untersuchung wurde in der Leber ein geringgradiger Gehalt an *Bergeyella zoohelcum* sowie ein mittelgradiger Gehalt an *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella* spp. nachgewiesen. In der Niere wurde ein geringgradiger Gehalt an *Mannheimia haemolytica* und *Pasteurella* spp. festgestellt. Das Tier wurde mit Hilfe von PCR und TH-1-Zellkultur auf Herpesviren und Ranaviren untersucht. Aus Organgewebe fiel der Nachweis von Herpesvirus negativ, der Nachweis von Ranavirus positiv aus. Für die eigenen Untersuchungen wurde ein Virusiolat aus Nierengewebe verwendet.

**Virus 5810/07** stammt von einer weiblichen *Testudo hermanni* „Helena“ aus Bestand F. „Helena“ war ca. 50 bis 60 Jahre alt, wahrscheinlich ein Wildfang und wog 1.565 g. Diese Schildkröte war mit zwei weiteren Schildkröten am 20.10.2007 in den Bestand F gekommen. Alle drei Schildkröten erkrankten, „Helena“ am schwersten. Sie zeigte vorberichtlich Inappetenz, schleimige Beläge im Maul mit auffällig knallroten Schleimhäuten mit leichten Blutungen und einen rot verfärbten Bauchpanzer. Sie wurde vom Haustierarzt mit einem Paraimmunitätsinducer, Antibiotikum und Infusionen behandelt. Sie starb jedoch nach einer Krankheitsdauer von sechs Tagen. Daraufhin wurde „Helena“ zur Sektion in das CVUA OWL geschickt.

Die Schildkröte zeigte sich in der Sektion in einem guten Ernährungszustand. Die Mundschleimhäute waren blutig, und es waren petechiale Blutungen in der Schleimhaut des Pharynx zu sehen. Magen und Dünndarm enthielten nur Schleim. Blinddarm und Dickdarm wiesen eine ödematöse Schleimhaut mit petechialen Blutungen und zahlreiche Oxyuren spp. und Askariden spp. auf. Im Blinddarm waren außerdem diphtheroide Beläge ersichtlich. Auch in der Herzmuskulatur waren petechiale Blutungen zu erkennen. Die Milz zeigte sich deutlich vergrößert. Am Ovar waren Follikel in Regression zu sehen.

Bei der histologischen Untersuchung zeigte sich das Zungenepithel vollständig abgelöst. In den Epithelresten waren intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen zu erkennen. Die Lunge wies eine starke Infiltration mit heterophilen Granulozyten auf. Das Dickdarmepithel hatte sich ebenfalls abgelöst, und es war eine Infiltration mit heterophilen Granulozyten erkennbar. Die Milz war stark hyperämisch und mit vielen heterophilen Granulozyten durchsetzt.

Durch die bakteriologische Untersuchung wurde im Darm ein mittelgradiger Gehalt an alpha-hämolisierenden *Staphylococcus* spp. und *Citrobacter* spp., in der Leber ein geringgradiger Gehalt an *Citrobacter* spp. und *Klebsiella* spp., im Rachensekret ein mittelgradiger Gehalt an *Chryseobacterium indoligenes* und *Citrobacter* spp., sowie ein geringgradiger Gehalt an *Klebsiella* spp. nachgewiesen. Die Mykoplasmen-PCR (BROWN et al., 1995) sowie die Isolierung von Herpesviren in TH-1-Zellkultur verliefen negativ. Ranavirus ließ sich sowohl in der TH-1-Zellkultur isolieren als auch mit Hilfe der PCR (MAO et al., 1997) in Organewebe nachweisen. Für die eigenen Untersuchungen wurde ein Virusisolat aus Lungengewebe eingesetzt.

**Virus 6172/07** stammt von einem *Testudo hermanni*-Jungtier aus Bestand G. Diese Schildkröte wurde im November 2007 ohne Vorbericht zur Sektion in das CVUA OWL eingeschickt. In der Sektion wies die Schildkröte einen reduzierten Ernährungszustand auf. Die Schleimhaut der Maulhöhle war gerötet und mit schleimigen Belägen bedeckt. Magen und Darm waren fast leer, und die Schleimhaut war gerötet. Das Herz wies petechiale Blutungen im Myokard auf. Die Milz war vergrößert.

Bei der histologischen Untersuchung zeigten sich eine mittelgradige Fettleber und ein autolytischer Dünndarm. In der bakteriologischen Untersuchung wurden *Pseudomonas aeruginosa* in Leber und Niere, *Vibrio alginolyticus* in der Niere und *Salmonella* spp. der Gruppe O:28 nachgewiesen. Die virologische Untersuchung des Organewebes mit Hilfe von PCR und TH-1-Zellkultur fiel für Herpesvirus negativ, für Ranavirus positiv aus. Ein Virusisolat aus Lebergewebe wurde für die eigenen Untersuchungen verwendet.

**Virus 354/08** stammt von einem adulten *Testudo hermanni*-Weibchen aus Bestand S. Die Schildkröte war vorberichtlich seit 1984 in Besitz. Im Herbst 2007 hatte sie Kontakt mit einer an den Folgen einer Ranavirusinfektion gestorbenen Schildkröte gehabt. Anfang Januar 2008 war sie wach, munter und appetent. Drei Wochen später erkrankte sie, wurde nach einer Krankheitsdauer von zwei Tagen eingeschlafert und daraufhin zur Sektion in das CVUA OWL geschickt. Einen Tag nachdem das Weibchen euthanasiert worden war, erkrankte eine weitere Schildkröte und wurde ebenfalls eingeschlafert. Weitere 13 Schildkröten verblieben im Bestand.

In der Sektion zeigte die Schildkröte einen guten Ernährungszustand. Sie wies eine blutig-eitrige Stomatitis auf. Einzelne punktförmige Blutungen waren im Parenchym der Lunge zu erkennen. Die Milz war extrem vergrößert (walnussgroß) und von derber Konsistenz. Magen und Blinddarm waren leer. Die Magenschleimhaut zeigte sich etwas ödematös. Auf der ödematösen Dickdarmschleimhaut waren Petechien feststellbar. Im Dickdarm enthielt nur wenig Kot und Steinchen. Die Niere war von hellbeiger Farbe. Es waren vier ablagereife Eier in den Eileitern und am Ovar zahlreiche Follikel in Ausbildung zu sehen.

In der histologischen Untersuchung ließen sich im Zungengewebe eine eitrige Stomatitis mit Bakterienrasen, jedoch keine Einschlusskörperchen erkennen. Die Lunge zeigte sich hyperämisch mit fokalen Gewebeblutungen. Im Dickdarm waren herdförmige Schleimhautnekrosen zu sehen. Die Milz war hyperämisch mit fibrinoiden Exsudatablagerungen im Gewebe. Einwanderung von heterophilen Granulozyten und kaum Parenchym waren zu sehen.

Parasitologisch ließen sich im Darm ein mittelgradiger Befall mit *Oxyuren* spp. und ein hochgradiger Befall mit *Trichomonas* spp. nachweisen. Bakteriologisch wurden in der Leber aerobe Sporenbildner, coliforme Keime, *Mannheimia hämolytica*, *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. nachgewiesen, in der Niere coliforme Keime und *Streptococcus* spp.. Aus Organewebe fiel der Nachweis von Herpesvirus negativ aus, der Nachweis von Ranavirus in Organewebe war mittels TH-1-Zellkultur und PCR (MAO et al., 1997) positiv. Ein Virusisolat aus der Milz wurde für die eigenen Untersuchungen genutzt.

Ebenfalls wie die *Testudo hermanni* „Helena“ (s. Virus 5810/07) stammt eine *Testudo hermanni*, aus der das **Virus CU10/08** isoliert wurde, aus Bestand F. Zu zwei jungen *Testudo hermanni* wurden im Dezember 2007 eigene Schildkröten gesetzt. Eine Woche danach trat der erste Todesfall auf. Alle Schildkröten dieser Gruppe wurden am 22.12.2007 eingeschläfert. Sechs *Testudo hermanni* wurden zur Sektion an das CVUA OWL geschickt.

Schildkröte CU10/08 war ein 18 cm großes und 0,85 kg schweres *Testudo hermanni*-Männchen. In der Sektion zeigten sich eine gerötete Lunge und eine geringgradig vergrößerte Milz. Der Dickdarm enthielt wenig Kot. Ansonsten war der Magen-Darm-Trakt leer. Es ließ sich ein hochgradiger Befall mit Oxyuren spp. feststellen. Mit Hilfe der PCR (MAO et al., 1997) konnte in den untersuchten Organen (Hirn, Zunge, Lunge, Herz, Leber, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Niere und Hoden) Ranavirusgenom nachgewiesen werden. In der TH-1-Zellkultur zeigte sich nach Inokulation der Organe Zunge, Lunge, Herz, Leber, Dickdarm und Milz ein Ranavirus-typischer cpE. Für die eigenen, weiterführenden Untersuchungen wurde ein Virusisolat aus der Zunge eingesetzt.

**Virus CU60/09** wurde aus einem adulten *Testudo marginata*-Männchen aus Bestand E isoliert. Angaben über die Krankheitsgeschichte in diesem Bestand finden sich aufgrund der besseren Verständlichkeit unter Punkt 3.12.

In der Sektion zeigte sich ein geringgradig weicher, etwas dünner Panzer. Im Bereich der Vorderbeine und des Halses war die Unterhaut mittelgradig ödematös. In der Muskulatur des rechten Vorderbeines waren Einblutungen zu erkennen. Auf der Zunge und auf den Maulschleimhäuten, vor allem im rostralen Bereich, zeigten sich gelblich-weißliche, nicht ablösbare Beläge. Die Körperhöhle enthielt eine rötlich-durchscheinende Flüssigkeit. Die Leber war von hellbrauner bis rötlicher Farbe mit multifokalen, gelblichen und zum Teil rot-schwarzen Verfärbungen. Der Magen und der Dünndarm waren bis auf geringgradig weißlich-grüner Schleim leer. Am Übergang zum Dickdarm waren einzelne, im Blinddarm massiv Oxyuren spp. zu sehen. Der Dickdarm enthielt einen festen grünlichen Inhalt.

In der histologischen Untersuchung zeigte sich, dass dem Zungenepithel etwas entzündliches Exsudat auflag. Die Schleimhaut der Trachea zeigte sich verdickt mit fokalen Nekrosen sowie Rundzellularinfiltraten. Die Lunge war etwas ödematös. Vereinzelt waren intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen zu sehen. In der Leber waren einzelne Nekrosen, vereinzelt heterophile Granulozyten und eine geringgradige Vakuolenbildung in den Hepatozyten vorhanden. Im Pankreas ließen sich winzige Herde heterophiler Granulozyten erkennen. Zwischen dem Milzgewebe befanden sich viele heterophile Granulozyten und fibrinöses Material. Das Lumen des Dickdarms enthielt zahlreiche Oxyuren spp. Die Epidermis des rechten Vorderbeins war zum Teil nekrotisch. Außerdem waren ein starkes Unterhautödem und eine Vaskulitis der Dermis zu sehen. In der Muskulatur des rechten Vorderbeins waren eingewanderte heterophile Granulozyten und Lymphozyten sowie Einblutungen zu erkennen.

Im Ellbogengelenk des rechten Vorderbeins wurden ein geringgradiger Gehalt an alpha-hämolisierenden *Streptococcus* spp., ein hochgradiger Gehalt an *Corynebacterium* spp., ein mittelgradiger Gehalt an *Morganella* spp. und ein geringgradiger Gehalt an *Vibrio parahämolyticus* nachgewiesen. In der Lunge zeigte sich ein geringgradiger Gehalt an alpha-hämolisierenden *Streptococcus* spp., ein mittelgradiger Gehalt an *Corynebacterium* spp., ein geringgradiger Gehalt an *Morganella* spp. und ein mittelgradiger Gehalt an *Pseudomonas* spp. In der Leber wurden ein geringgradiger Gehalt an alpha-hämolisierenden *Streptococcus* spp. und *Corynebacterium* spp. nachgewiesen. In der Niere wurde ein mittelgradiger Gehalt an *Corynebacterium* spp. und ein geringgradiger Gehalt an *Pseudomonas* spp. nachgewiesen.

Virologisch wurden die Organe Hirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Leber, Magen, Pankreas, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Niere, Blase, Hoden, Nebenhoden, Muskulatur des rechten Vorderbeins sowie des rechten Hinterbeins untersucht. Mit Hilfe der PCR (MAO et al., 1997) konnte in allen untersuchten Organen mit Ausnahme der Muskulatur des rechten Hinterbeins Ranavirusgenom nachgewiesen werden. Auf TH-1-Zellkultur wurde durch die Organe Hirn, Zunge, Trachea, Lunge, Leber, Pankreas, Niere, Nebenhoden und Muskulatur des rechten Vorderbeins ein Ranavirus-typischer cpE hervorgerufen.

### 3.12 Tupfer- und Serumproben aus Beständen mit Erkrankungen nach Infektion mit Ranavirus

Da Erkrankungsfälle durch Infektion mit Ranavirus in Deutschland noch selten sind, war es notwendig, alle erhaltenen Proben in die Auswertung einzubeziehen. Somit stand eine größere Anzahl an Proben von sowohl erkrankten als auch möglicherweise infizierten Schildkröten zur Verfügung, anhand derer der Verlauf der Erkrankung und die Entwicklung von Antikörpertitern untersucht werden konnte. Da es sich bei den Beständen, in denen Erkrankungen nach Infektion mit Ranavirus aufgetreten waren, um private Bestände handelte, waren nicht aus allen Beständen gleich viele Proben zu erhalten. Aus einem Teil der betroffenen Bestände wurden in unregelmäßigen Abständen Rachen- und Kloakentupferproben sowie Serumproben eingeschickt, um den weiteren Verlauf der Krankheit zu überwachen. Die Schildkröten von Bestand M, E und H wurden eingehend nachuntersucht, um den Krankheitsverlauf, die Virusausscheidung und die Antikörperbildung zu verfolgen.

Im **Bestand M** erkrankten zusätzlich zu dem *Testudo hermanni*-Weibchen „Ayla“ (s. Virus 4152/07) drei weitere *Testudo hermanni*. Zwei Tage (23.7.2007) nach der Erstvorstellung von „Ayla“ wurde ein sechs Jahre altes und 482 g schweres Weibchen „Minni“ beim Haustierarzt vorgestellt. „Minni“ wurde wegen schnupfenähnlicher Symptome wie Niesen und Nasenausfluss sowie veränderter Maulschleimhaut gebracht. Ferner fiel auf, dass sie aufgenommene Futterstücke ohne zu schlucken sofort wieder ausspuckte. Der Haustierarzt stellte einen guten Ernährungs- und Pflegezustand fest. Es waren Nasenausfluss, im Maul weißliche Beläge und zäher rauchig-weißlicher Schleim im Bereich der Zunge, der Maulkanten und des Rachens vorhanden. „Minni“ wurde mit Enrofloxacin (5 mg/kg KGW) und Oxytetracyclin (10 mg/kg KGW) alle zwei Tage, dreimaliger (Tag 1, 4 und 10) Zylexis®-Gabe und täglich Aciclovir p.o. (80 mg/kg KGW) behandelt. Die Veränderungen in der Maulhöhle wurden lokal mit dem Antiseptikum Hexetidin bepinselt. Ungefähr zwei Wochen nach Beginn dieser Therapie hatten sich die Symptome vollständig zurückgebildet, und „Minni“ zeigte ein ungestörtes Allgemeinbefinden.

Etwa zwei Wochen (4.8.2007) nach der Erstvorstellung von „Minni“ beim Haustierarzt wurde ein fünf Jahre altes, 350 g schweres Weibchen „Fips“ beim Haustierarzt vorgestellt, welches durch zögerliches Fressen frischen Futters aufgefallen war. „Fips“ zeigte bei der klinischen Untersuchung keine erkennbaren Veränderungen, schien jedoch ein mäßig gestörtes Allgemeinbefinden zu haben. Dieses Weibchen wurde mit dreimaliger (Tag 1, 4 und 10) Zylexis®-Gabe und Aciclovir (80 mg/kg KGW) behandelt. „Fips“ entwickelte keine klinischen Symptome und zeigte ca. acht Wochen nach Beginn der Therapie ein vollkommen ungestörtes Allgemeinbefinden mit selbstständiger Futteraufnahme.

Ca. zwölf Tage nach „Fips“ wurde das zehn Jahre alte und 950 g schwere Männchen „Mucki“ beim Haustierarzt vorgestellt. Er zeigte dieselben Symptome wie „Ayla“ nur in abgeschwächter Form. „Mucki“ wurde nach demselben Plan wie „Minni“ behandelt. Nach einer Woche verstärkte sich die Schleimbildung, woraufhin zusätzlich Bisolvon® verabreicht wurde. Während der folgenden Tage entwickelte sich eine muköse Konjunktivitis mit massiver Schwellung der Augenlider, die lokal mit Augensalbe behandelt wurde. Acht Tage später erschien „Mucki“ munterer und fraß erstmalig wieder selbstständig. Weitere drei Tage später verschlechterte sich sein Allgemeinbefinden jedoch stark, und es trat extremer Nasenausfluss auf. Aufgrund dramatisch zunehmender Schwäche wurde „Mucki“ einige Tage später eingeschläfert. Es wurde vom Eigentümer jedoch keine Sektionserlaubnis erteilt.

Die verbleibenden zwei adulten Weibchen („Möppi“ und „Puh“) sowie die vier Jungtiere von „Mucki“ und „Ayla“ aus dem Jahr 2007 („Kiara“, „Pünnchen“, „Sternchen“ und „Maya“) blieben symptomlos.

Am 20.2.2008 wurden Rachenabstriche von sieben Schildkröten („Minni“, „Fips“, „Möppi“, „Kiara“, „Pünnchen“, „Sternchen“ und „Maya“) zur Untersuchung auf das Vorhandensein von Ranaviren eingesandt. Ein knappes Jahr nach Auftreten der Erkrankung (18.7.2008) wurden Serumproben von den beiden genesenen Schildkröten „Minni“ und „Fips“ an das CVUA OWL geschickt. Im darauf folgenden Jahr (25.11.2009) wurden abermals Rachentupfer- und Serumproben von den beiden genesenen Schildkröten „Minni“ und „Fips“ sowie



von fünf der nicht erkrankten Schildkröten („Möppi“, „Kiara“, „Püktchen“, „Sternchen“ und „Maya“) eingeschickt.

In **Bestand B** wurde Mitte November 2007 eine Schildkröte, bei der im weiteren Verlauf Ranavirus nachgewiesen wurde, zu anderen Schildkröten in ein Gewächshaus gesetzt. Von Schildkröten, die sich im selben Gewächshaus befanden, wurden mehrmals Tupferproben und Seren eingesandt. Ein Teil der Schildkröten hatte direkten Kontakt mit der infizierten Schildkröte gehabt. Andere Schildkröten hatten sich zu diesem Zeitpunkt schon unter der Erde eingegraben, so dass kein direkter Kontakt bestanden hatte. Am 18.12.2007 wurden Rachen- und Kloakentupferproben sowie Seren von 18 Schildkröten, am 11.2.2008 Rachen- und Kloakentupferproben von drei Schildkröten, am 27.2.2008 Rachen- und Kloakentupferproben von vier Schildkröten sowie zwei Seren und am 16.3.2008 Rachen- und Kloakentupferproben von sechs Schildkröten eingeschickt.

In **Bestand F** wurden die drei mit Ranavirus infizierten *Testudo hermanni* (s. Virus 5810/07) von den anderen Schildkröten getrennt gehalten. Es wurde jedoch keine Desinfektion der Hände oder von Gegenständen, die mit den infizierten Schildkröten in Kontakt gekommen waren, durchgeführt. Zwei Tage nach dem Zukauf der drei Schildkröten (22.10.2007) wurde die Breitrandschildkröte „Mara“ für fünf bis zehn Minuten zu diesen gesetzt. Als dabei bei den drei Griechischen Landschildkröten die Beläge im Maul auffielen, wurde „Mara“ wieder entfernt. „Mara“ zeigte sich zuerst nur ein wenig ruhig. Erst nach dem Winterschlaf im Winter 2007/08 fiel eine geringgradige Entzündung der Maulhöhle auf. Von „Mara“ wurden am 17.12.2007 Rachen- und Kloakentupferproben sowie eine Serumprobe eingeschickt.

Von einer *Testudo hermanni* wurden am 18.12.2007 Rachen- und Kloakentupferproben sowie Serum eingeschickt. Von der *Testudo hermanni*-Gruppe, die komplett getötet wurde (s. Virus CU10/08), wurde von den sechs Sektionstieren sowie einer weiteren Schildkröte Serum gewonnen. Die Sektionsbefunde der verbleibenden Schildkröten lauten wie folgt:

Ein 23 cm großes und 1,6 kg schweres *Testudo hermanni*-Weibchen (CU8/08) zeigte in der Sektion gelbe Beläge auf der Zunge und eine gerötete Lunge. Die Milz stellte sich dunkelrot und vergrößert dar. Der Magen-Darm-Trakt war leer bis auf einen dickbreiigen Inhalt im Dickdarm. Es war außerdem ein hochgradiger Befall mit *Oxyuren* spp. feststellbar. Am Ovar zeigten sich Follikel in Regression. In der virologischen Untersuchung konnte in den untersuchten Organen (Hirn, Zunge, Lunge, Herz, Leber, Dünndarm, Dickdarm, Milz und Niere) mittels PCR (MAO et al., 1997) Ranavirusgenom nachgewiesen werden. In der TH-1-Zellkultur zeigte sich jedoch kein cpE.

Schildkröte CU9/08 war ein 13,5 cm großes und 0,5 kg schweres *Testudo hermanni*-Männchen. In der Sektion zeigten sich gelbe Beläge auf den Schleimhäuten der Maulhöhle. Die Milz war vergrößert und gerötet. Der Magen war mit Futter gefüllt, der Dünndarm leer. Der Dickdarm war mit dickbreiigem Kot gefüllt und zeigte einen hochgradigen Befall mit *Oxyuren* spp. In allen untersuchten Organen (Hirn, Zunge, Lunge, Herz, Leber, Dünndarm, Dickdarm, Milz und Niere) konnte mittels PCR (MAO et al., 1997) Ranavirusgenom nachgewiesen werden. Nach Verimpfung auf TH-1-Zellkultur war nur bei den Organen Zunge, Dickdarm und Milz ein Ranavirus-typischer cpE zu erkennen.

Ein 14 cm großes und 500 g schweres, juveniles *Testudo hermanni*-Weibchen (CU11/08) war in der Sektion relativ unauffällig. Es war etwas Schleim in der Maulhöhle zu erkennen. Der Magen war mit Futter gefüllt. Der Dünndarm war leer. Der Dickdarm enthielt Kot. In der PCR (MAO et al., 1997) zeigten sich die Organe Hirn und Milz positiv für den Nachweis von Ranavirusgenom. Die TH-1-Zellkultur war für alle untersuchten Organe (Hirn, Zunge, Lunge, Herz, Leber, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Niere und Ovar) negativ.

Schildkröte CU12/08 war ein 20 cm großes und 1,255 kg schweres *Testudo hermanni*-Weibchen. Auf der Zunge waren schleimige Beläge zu erkennen. Der Magen-Darm-Trakt war bis auf pflanzlichen Kot im Dickdarm leer. Am Ovar befanden sich Follikel in Ausbildung. Mittels PCR (MAO et al., 1997) konnte in Hirn, Zunge, Leber, Milz und Ovar Ranavirusgenom nachgewiesen werden. Die TH-1-Zellkultur war für alle untersuchten Organe (Hirn, Zunge, Lunge, Herz, Leber, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Niere und Ovar) negativ.

Die sechste Schildkröte (CU13/08) dieser Gruppe war ein 25 cm großes und 1,5 kg schweres *Testudo hermanni*-Weibchen. In der Sektion zeigten sich Beläge in der Maulhöhle. Der Magen-Darm-Trakt war bis auf pflanzlichen Kot im Dickdarm leer. Am Ovar befanden sich Föllikel in Anbildung. In allen untersuchten Organen (Hirn, Zunge, Lunge, Herz, Leber, Dünndarm, Dickdarm, Milz und Niere) konnte mittels PCR (MAO et al., 1997) Ranavirusgenom nachgewiesen werden. In der TH-1-Zellkultur wurde nach Verimpfen von Zunge und Lunge ein Ranavirus-spezifischer cpE hervorgerufen.

Tabelle 5 und 6 geben einen Überblick über die virologischen Befunde der untersuchten Organe der Schildkröten CU8/08-CU13/08.

Am 15.1.2008, am 18.2.2008 und am 24.2.2008 wurden Rachen- und Kloakentupferproben von jeweils vier Schildkröten aus Bestand F zur Untersuchung auf das Vorhandensein von Ranavirus eingesendet. Von zwei *Testudo hermanni* wurde zusätzlich Serum mitgeschickt.

**Tabelle 5:** Übersicht über die PCR-Befunde der Schildkröten CU8/08-CU13/08

Tier	Hi	Zu	Lu	He	Le	DüDa	DiDa	Mi	Ni	Ov/Ho
CU8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.u.
CU9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.u.
CU10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CU11	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
CU12	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+
CU13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n.u.

Legende:

Hi: Hirn, Zu: Zunge, Lu: Lunge, He: Herz, Le: Leber, DüDa: Dünndarm, DiDa: Dickdarm, Mi: Milz, Ni: Niere, Ov: Ovar, Ho: Hoden

+

-

n.u.

**Tabelle 6:** Übersicht über die Zellkultur-Befunde der Schildkröten CU8/08-CU13/08

Tier	Hi	Zu	Lu	He	Le	DüDa	DiDa	Mi	Ni	Ov/Ho
CU8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	n.u.
CU9	-	+	-	-	-	-	+	-	-	n.u.
CU10	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
CU11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CU12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CU13	-	+	+	-	-	-	-	-	-	n.u.

Legende:

Hi: Hirn, Zu: Zunge, Lu: Lunge, He: Herz, Le: Leber, DüDa: Dünndarm, DiDa: Dickdarm, Mi: Milz, Ni: Niere, Ov: Ovar, Ho: Hoden

+ : Ranavirus isoliert

- : Ranavirus nicht isoliert

n.u. : nicht untersucht

**Bestand E** wurde im Rahmen dieser Arbeit intensiv nachuntersucht, um Aufschluss über die Virusübertragung, eine mögliche Latenz des Virus und die Antikörperbildung zu erhalten. Außer Tupfer- und Serumproben wurden mir auch vier Schildkröten zur weiteren Beobachtung und Untersuchung überlassen (s. Punkt 3.15).

Im Sommer 2008 erkrankten die ersten Schildkröten im Bestand E. Am 11.7.2008 wurde ein juveniles *Testudo hermanni*-Weibchen (2860/08) zur Sektion an das CVUA OWL geschickt. In der Sektion zeigte sich die Schildkröte in einem reduzierten Ernährungszustand. In der Maulhöhle war eine blutige, diphtheroide Entzündung zu sehen. Die Lunge war gerötet. Die Milz zeigte sich deutlich vergrößert. Der Magen-Darm-Trakt war insgesamt gerötet. Blind- und Dickdarm enthielten dickbreiigen Kot. Histologisch ließen sich eine hochgradige Fettleber und eine Hyperämie der Milz feststellen. Parasitologisch wurde ein hochgradiger Befall mit Oxyuren spp. nachgewiesen. Bakteriologisch wurde in der Leber ein mittelgradiger Befall mit *Corynebacterium* spp. und in der Niere ein mittelgradiger Gehalt an alpha-hämolisierende *Streptococcus* spp. und ein geringgradiger Gehalt an *Corynebacterium* spp. nachgewiesen. Mittels PCR (MAO et al., 1997) und TH-1-Zellkultur wurde Ranavirus nachgewiesen.

Am 24.7.2008 wurden Seren von 14 Schildkröten, die in Kontakt mit den erkrankten gewesen waren, eingesandt. Die Schildkröten waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesund. Sie erkrankten jedoch ca. zwei Wochen später und starben bzw. wurden eingeschläfert.

Drei Seren von Schildkröten (zwei *Testudo hermanni* und eine *Testudo marginata*), die nach vierwöchiger Krankheit mit eitriger Stomatitis und Behandlung mit Zylexis® und Ceflazidin genesen waren, wurden am 23.9.2008 eingesandt. Die zwei *Testudo hermanni* erkrankten später nochmals und starben.

Am 13.11.2008 erhielt ich dankenswerter Weise eine *Testudo marginata* (CU60/09) und eine *Testudo hermanni* („Gertrude“) zur weiteren Beobachtung. „Gertrude“ war schon seit mehreren Wochen schwer erkrankt. Schildkröte CU60/09 entspricht der *Testudo marginata*, von der am 23.9.2008 Serum eingesandt worden war (E2.3).

Am 29.5.2009 wurde ein *Testudo graeca*-Weibchen (1519/09) zur Sektion in das CVUA OWL geschickt. Die Schildkröte zeigte sich in der Sektion in einem guten Ernährungszustand. In der Maulhöhle waren schleimige Beläge zu sehen. Die Milz war stark vergrößert. Der Magen-Darm-Trakt war leer. An den Eierstöcken befanden sich Follikel in Anbildung. Histologisch zeigten sich schleimige Beläge auf dem Zungenepithel sowie Fibrin in der Milz. Bakteriologisch wurde in der Leber ein geringgradiger Gehalt an aeroben Sporenbildnern sowie *Staphylococcus* spp. nachgewiesen. Aus der Niere wurde ein geringgradiger Gehalt an aeroben Sporenbildnern, *Pseudomonas stutzeri*, *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. isoliert. Ranavirus wurde in Organgewebe durch PCR (MAO et al., 1997) und TH-1-Zellkultur nachgewiesen.

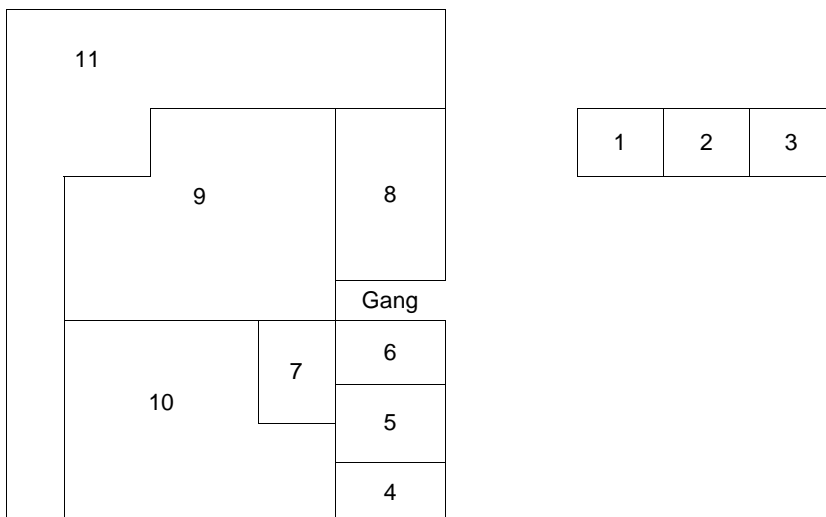
Am 17.6.2009 erhielt ich abermals zwei Schildkröten (*Testudo hermanni*) zur weiteren Beobachtung. „Klaus“ war schon mehrmals erkrankt. „Agatha“ hatte sich bisher unauffällig verhalten. Bei einer Kontrolle waren dem Besitzer jedoch Beläge in der Maulhöhle aufgefallen.

Am 9.7.2009 wurde von allen Schildkröten aus dem Bestand E (außer den Jungtieren von 2009) Rachen- und Kloakentupferproben sowie Blutproben genommen. Die Blutentnahme erfolgte aus dem subcarapazialen Sinus (HERNANDEZ-DIVERS, 2006).

Die Schildkröten in Bestand E werden ganzjährig draußen gehalten. In den elf Gehegen wachsen Gräser und verschiedene zweikeimblättrige Wildpflanzen. Ein Teil des Bodens ist mit Kies oder Steinplatten bedeckt. In jedem Gehege ist eine Schutzhütte vorhanden. Die einzelnen Gehege sind durch flache Steinmauern bzw. Holzzäune getrennt, so dass kein direkter Kontakt zwischen den Schildkröten in den verschiedenen Gehegen besteht. Indirekte Virusübertragung ist jedoch über die Schuhe oder freilaufende Tiere (Katzen, Mäuse, Schnecken etc.) möglich.

Laut Besitzer zeigten viele der erkrankten Schildkröten Beläge in der Maulhöhle. Erkrankte Schildkröten waren vom Haustierarzt mit Antibiotika, Immunmodulatoren, Infusion und Augensalbe behandelt worden. Bei schwer erkrankten Schildkröten erfolgte Zwangsfütterung. Ein großer Teil (ca. 70 %) der erkrankten Schildkröten starb trotz der Behandlungen. Die Schildkröten gingen zum Sterben selbst im Winter raus aus den Schutzhütten auf die Wiese und suchten auch keinen Schutz unter Büschen oder ähnlichem.

Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über die Lage der einzelnen Gehege in Bestand E.



**Abbildung 6:** Schema der Anordnung der Gehege im Bestand E

Zur Zeit der Probennahme wurden dreizehn Neuzugänge räumlich von den anderen Schildkröten getrennt gehalten. Davon befanden sich fünf *Testudo hermanni* in Gehege 1 (E3.9-13). In Gehege 2 lebten zwei *Testudo graeca* sowie eine *Testudo marginata* (E3.1-3). In Gehege 3 waren fünf *Testudo hermanni* (E3.4-8) untergebracht.

In Gehege 4 befand sich ein noch junges *Testudo hermanni*-Männchen (E3.39). In diesem Gehege hatte vorher eine größere Gruppe Jungtiere gelebt, die alle aufgrund einer Ranavirusinfektion erkrankt waren und alle bis auf das verbliebene Männchen gestorben waren.

In Gehege 5 befanden sich vier *Terrapene carolina* (E3.14-17). In Gehege 8 lebten acht *Testudo hermanni* (E3.18-25), die aus Kroatien importiert worden waren. Die Schildkröten aus den Gehegen 5 und 8 waren bisher unauffällig, durch die räumliche Nähe zu infizierten Schildkröten konnte eine Virusübertragung jedoch nicht ausgeschlossen werden.

In Gehege 9 befanden sich die zwei verbliebenen Schildkröten des Altbestandes, eine *Testudo marginata* (E3.37) und eine *Testudo hermanni* (E3.38). Zu dieser Gruppe gehörten auch die Schildkröten, die als erstes aufgrund einer Ranavirusinfektion erkrankt waren (s. 2860/08), sowie drei der Schildkröten, die mir zur Verfügung gestellt wurden (CU60/09, „Gertrude“ und „Klaus“). Alle Schildkröten dieser Gruppe waren erkrankt, jedoch nur die beiden verbliebenen sowie die drei abgegebenen Schildkröten hatten die Erkrankung überlebt.

In Gehege 10 lebte eine Gruppe bestehend aus sieben *Testudo hermanni* (E3.26-31 und E3.34), einer *Testudo marginata* (E3.32) und einer *Testudo graeca* (E3.33). Diese Schildkröten waren aus einem Tierpark in Österreich importiert worden. Ein Männchen, welches auch in diesem Gehege lebte, war zu den erkrankten Jungtieren in Gehege 4 geklettert. Als dieses dem Besitzer wenige Stunden später auffiel, wurde das Männchen wieder zurück in sein Gehege gesetzt. Das Männchen zeigte eine Woche später eitrig-eitrige Maulbeläge und starb. Kurz darauf starb auch die *Testudo graeca* 1519/09, die auch aus Gehege 10 stammte. Die mir zur Verfügung gestellte Schildkröte „Agatha“ stammte ebenfalls aus dieser Gruppe. Die verbliebenen neun Schildkröten waren bisher unauffällig gewesen.

Zwei *Testudo hermanni* (E3.35 und E3.36) befanden sich zur Zeit der Probenahme zur Pflege beim Tierarzt wegen großflächiger Nekrosen des Panzers, von denen vor allem die kaudalen Pleuralschilde des Carapax betroffen waren. In Gehege 11 lebte ein einzelnes *Geochelone sulcata*-Männchen (E.3.40). Dieses war vorher bei dem Altbestand (s. Gehege 9) mitgelaufen. Bei dem Auftreten der Erkrankungen war es jedoch in ein Einzelgehege verbracht worden. Bei dieser Schildkröte waren keine Krankheitssymptome aufgefallen.

Am 20.9.2009 wurden von drei Schildkröten Rachen- und Kloakentupferproben sowie Serum eingeschickt. Das Serum E4.1 stammt von der *Testudo marginata* E3.32. Das Serum E4.2 stammt von der *Testudo graeca* E3.2. Das Serum E4.3 entspricht der *Testudo graeca* E3.33.

In **Bestand H** lebt eine *Testudo hermanni* (H1.1), die aus derselben Importgruppe aus dem Tierpark in Österreich stammt, wie die Schildkröten aus Bestand E (s. Gehege 10). Am 12.7.2009 wurden Rachen- und Kloakentupferproben sowie Serum von dieser Schildkröte eingeschickt.

Im August 2009 wurden drei Schildkröten (E3.37, E3.38 und E3.39) aus Bestand E in Bestand H übernommen. Diese drei Schildkröten werden dort strikt von den anderen Schildkröten getrennt gehalten.

Am 20.9.2009 wurden Rachen- und Kloakentupferproben sowie Seren von 21 Schildkröten eingeschickt. Neun *Testudo hermanni* (H2.9-17) lebten seit einem Jahr gemeinsam in einem Gehege. Schildkröte H2.17 entspricht der Schildkröte H1.1. In dem Nachbargehege dieser Schildkröten befinden sich acht *Testudo graeca* (E2.1-8). Die Schildkröten H2.18 und H2.19 sind die beiden *Testudo hermanni* aus Bestand E, wobei H2.18 Schildkröte E3.38 und H2.19 Schildkröte E3.39 entspricht. Eine juvenile *Testudo hermanni* (H2.20) lebte vorher in der Gruppe H2.9-17 und war nun zu einer *Testudo hermanni* (H2.21), die im Juli direkt aus Griechenland importiert worden war, gesetzt worden.

Somit stehen insgesamt 132 Seren von Schildkröten aus Beständen, in denen Erkrankungen nach Infektion mit Ranavirus aufgetreten waren, zur Verfügung. Von diesen Seren stammen 108 Seren von *Testudo hermanni*, 13 Seren von



*Testudo graeca*, 6 Seren von *Testudo marginata*, 4 Seren von *Terrapene carolina* und ein Serum von einer *Geochelone sulcata*.

Die Nummern der Seren setzen sich folgendermaßen zusammen: Der Buchstabe steht für den Bestand, aus dem das Serum stammt. Die erste Zahl gibt die Anzahl der Einsendungen an. Die Seren einer Einsendung wurden fortlaufend nummeriert, so dass die zweite Zahl für eine einzelne Schildkröte steht. Eine Ausnahme bilden die Seren der Schildkröten „Gertrude“, „Agatha“ und „Klaus“. Von diesen Schildkröten wurde mehrmals Serum gewonnen. In diesem Fall wurden der Anfangsbuchstabe des Names sowie eine fortlaufende Nummerierung zur Kennzeichnung der Seren gewählt. Tabelle 36 im Anhang gibt einen Überblick über die Seren, die aus Ranavirus-infizierten Beständen stammen.

### **3.13 Ursprünglich zur Diagnostik auf Antikörper gegen Herpesviren eingesandte Seren**

Zusätzlich zu den oben genannten 132 Seren wurden 106 Schildkrötenserum untersucht, die im Jahr 2009 an das CVUA OWL zur Herpesvirusdiagnostik geschickt worden waren. Diese Seren waren entweder zur Statusabklärung bei Zukäufen oder bei Verdacht einer Herpesvirus-bedingten Erkrankung eingeschickt worden. Der Nachweis von Antikörpern gegen ein Schildkrötenherpesvirus wird im CVUA OWL mit Hilfe eines Neutralisationstests durchgeführt. Um den bei Schildkrötenherpesviren vorkommenden antigenetischen Unterschieden Rechnung zu tragen, werden zwei antigenetisch verschiedene Testviren eingesetzt. Zum einen wird Virus 770/95, welches aus einer *Testudo hermanni* stammt, zum anderen Virus 1432/94 verwendet, welches aus einer *Testudo horsfieldii* isoliert wurde (TORNEDE, 2007).

Die 106 Schildkrötenserum gliedern sich auf in 74 Seren von *Testudo hermanni*, 28 Seren von *Testudo graeca* und 4 Seren von *Indotestudo elongata*. Es waren 98 Seren ausgewählt worden, bei denen sich keine Herpesvirusantikörper gegen beide Testviren nachweisen ließen. Der Titer eines Serums fiel in den fraglichen Bereich. Sieben Seren, in denen Herpesvirusantikörper nachgewiesen worden waren, wurden zum Ausschluss von Kreuzreaktionen untersucht. In je

drei Seren waren Antikörper gegen Virus 770/95 bzw. gegen Virus 1432/94 und in einem Antikörper gegen beide Viren nachgewiesen worden.

Die Tabelle 37 im Anhang gliedert jedes einzelne Serum nach Spezies und Ergebnis des Herpesvirus-Serumneutralisationstests auf.

### **3.14 Zusammenfassung der Befunde der seziierten Schildkröten**

Die Tabelle 7 liefert einen Überblick über die Befunde der seziierten Schildkröten, bei denen eine Ranavirusinfektion mittels Anzüchtung in TH-1-Zellkultur oder mit Hilfe der PCR diagnostiziert wurde. Die Vorberichte waren zum Teil leider wenig aussagekräftig oder gar nicht vorhanden. Da es sich bei den eingesendeten Schildkröten um Tiere aus Privatbeständen handelte, die zum Teil sehr viele Schildkröten durch die Erkrankungen in Folge einer Ranavirusinfektion verloren hatten, war es nicht möglich, weitere aussagekräftige Angaben zu erhalten. Nicht in allen Fällen wurde eine komplette Untersuchung durchgeführt. Je nach Wunsch des Besitzers oder schon bekannter Krankheitsgeschichte wurden einige Teile der Untersuchung gar nicht oder nur verkürzt durchgeführt. Nur nach 9 von 15 Sektionen wurde eine bakteriologische Untersuchung durchgeführt. Dabei wurde eine Vielzahl verschiedener Bakterien isoliert. Es waren jedoch keine vermehrten Nachweise bestimmter Bakterienspezies zu erkennen. Bei 9 der 15 seziierten Schildkröten wurde ein Befall mit *Oxyuren* spp. nachgewiesen. Zwei Schildkröten waren zusätzlich von einer weiteren Parasitenart (*Askariden* spp. bzw. *Trichomonas* spp.) befallen.

In der Sektion zeigten sich bei 14 von 15 Schildkröten Veränderungen in der Maulhöhle. Diese Veränderungen reichten von einer leichten Rötung und etwas Schleim bis zu einer blutig-eitrigen Entzündung und großflächig gelb-weißen Belägen. Bei 10 der 15 Schildkröten fiel zusätzlich eine Vergrößerung der Milz auf. Bei fünf Schildkröten waren Veränderungen im Magen-Darm-Trakt, bei vier Schildkröten Blutungen in verschiedenen Organen und bei drei Schildkröten eine gerötete Lunge zu erkennen. Intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen waren nur in vier Fällen zu finden. In zwei Fällen befanden sie sich im Epithel der Zunge und in jeweils einem Fall in der Niere bzw. der Lunge.

**Tabelle 7:** Übersicht über Vorberichte und häufigste Sektionsbefunde, der an den Folgen einer Ranavirusinfektion gestorbenen Schildkröten

Tier-Nr.	Vorbericht	Maulhöhle	Lunge	Milz	MDT	Blutungen	EK	Isolierte Bakterien	Parasiten
882	Schnupfen, geschwollene Augen	gerötet, Schleim	-	vergrößert, Nekrose	-	-	Zunge	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas mesophilica</i> , <i>Staphylococcus</i> spp.	-
4152	Anorexie, Nasenausfluss, Konjunktivitis, Atemgeräusch	weiße Beläge, leicht blutend	-	vergrößert	-	-	Niere	nicht untersucht	Oxyuren
5187	keine Angaben	gerötet, gelbe Beläge	-	-	ödematös (Dickdarm)	-	-	<i>Bergeyella zoohelcum</i> , <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Pasteurella</i> spp.	Oxyuren
5810	Inappetenz, gerötete Maulhöhle mit schleimigen Belägen, geröteter Bauchpanzer	blutig	-	vergrößert	diphtheroide Beläge (Blinddarm)	Petechien (Pharynx, Dickdarm, Herz, Blinddarm)	Zunge	alpha-hämolyisierende <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>Chryseobacterium indologenes</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	Oxyuren, Askariden
6172	keine Angaben	gerötet, schleimige Beläge	-	vergrößert	gerötet	Petechien (Herz)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Vibrio alginolyticus</i> , <i>Salmonella</i> spp. der Gruppe O:28	-
354	keine Angaben	blutig-eitrig	-	vergrößert	ödematös	Petechien (Lunge)	-	aerobe Sporenbildner, coliforme Keime, <i>Mannheimia haemolytica</i> , <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp.	Oxyuren, <i>Trichomonas</i> spp.
CU10	keine Angaben	-	gerötet	vergrößert	-	-	-	nicht untersucht	Oxyuren

Tabelle 7: Fortsetzung

Tier-Nr.	Vorbericht	Maulhöhle	Lunge	Milz	MDT	Blutungen	EK	Isolierte Bakterien	Parasiten
CU60	Anorexie, Maulausfluss, Beläge auf der Zunge, rechtes Vorbein ge- schwollen	gelb-weiße Be- läge	-	-	-	Muskulatur des rech- ten Vor- derbeins	Lunge	alpha-hämolyisierende <i>Streptococcus</i> spp., <i>Co- rynebacterium</i> spp., <i>Mor- ganella</i> spp., <i>Pseudomo- nas</i> spp., <i>Vibrio parahaë- molyticus</i>	Oxyuren
CU8	keine Angaben	gelbe Beläge	gerötet	vergrößert, dunkelrot	-	-	-	nicht untersucht	Oxyuren
CU9	keine Angaben	gelbe Beläge	-	vergrößert, rot	-	-	-	nicht untersucht	Oxyuren
CU11	keine Angaben	etwas Schleim	-	-	-	-	-	nicht untersucht	-
CU12	keine Angaben	schleimige Be- läge	-	-	-	-	-	nicht untersucht	-
CU13	keine Angaben	Beläge	-	-	-	-	-	nicht untersucht	-
2860	keine Angaben	blutige, diphtheroide Entzündung	gerötet	vergrößert, Hyperämie	gerötet	-	-	<i>Corynebacterium</i> spp., alpha-hämolyisierende <i>Streptococcus</i> spp.	Oxyuren
1519	keine Angaben	schleimige Be- läge	-	vergrößert	-	-	-	aerobe Sporenbildner, <i>Staphylococcus</i> spp., <i>Pseudomonas stutzeri</i> , <i>Streptococcus</i> spp.	-

Legende:

MDT: Magen-Darm-Trakt; EK: Einschlusskörperchen; - : obB

### 3.15 Schildkröten zur detaillierten Untersuchung

Vier Schildkröten (CU60/09, „Gertrude“, „Agatha“ und „Klaus“) aus Bestand E erhielt ich dankenswerter Weise zur weiteren Beobachtung (s. Punkt 3.12). Die Schildkröten wurden von mir artgerecht in einem Terrarium bzw. Außengehege gehalten und im Kühlschrank überwintert. Die Krankheitssymptome wurden dokumentiert. In regelmäßigen Abständen wurden Rachen- und Kloakentupferproben sowie Blutproben genommen. Dazu wurden Rachen und Kloake mit sterilen Tupfern abgestrichen. Die Tupfer wurden in 1 ml PBS verbracht und bis zur Untersuchung mit Hilfe von PCR und TH-1-Zellkultur eingefroren. Die Blutentnahme geschah aus dem subcarapazialen Sinus (HERNANDEZ-DIVERS, 2006). Die Blutproben wurden für 12 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank stehen gelassen. Danach wurde durch fünfminütige Zentrifugation bei 3.000 U/min (505 x g) das Serum gewonnen. Das Serum wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.16 Kultivierung von TH-1-Zellen

Verwendet wurde eine permanente, adhaerente Schildkrötenherzzelllinie (Terapene Heart, TH-1, subline B1) der ECACC (90102528). Die Zellen wurden bei 28 °C inkubiert und regelmäßig in Abständen von ca. sieben Tagen subkultiviert.

Vor dem Subkultivieren (Umsetzen) der Zellen auf eine neue Gewebekulturflasche (550 ml) wurden die Zellmorphologie und die eventuelle Anwesenheit von Keimen mikroskopisch überprüft. Die folgenden Schritte zur Subkultivierung wurden unter einer Sterilwerkbank vorgenommen.

Das verbrauchte Anzuchtmedium wurde abgegossen und der Zellrasen mit ca. 30 ml PBS gespült, um Reste des Mediums, insbesondere zweiwertige Kationen, zu entfernen, die bei der Trypsinierung des Zellrasens hinderlich sind. Anschließend wurde der Zellrasen mit ca. 30 ml einer 0,075 %igen Trypsin-PBS-Versen-Lösung bedeckt und für zwei Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die danach entstandene Suspension aus vereinzelt Zellen wurde mit einer Pipette gemischt, um eventuelle Zellaggregate zu dispergieren und

fünf Minuten bei 1.000 U/min (217 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und der Bodensatz in 5 ml Anzuchtmedium (MEM mit 20 % FKS, 1 % Gentamycin und 1 % Amphotericin B) durch Mischen mit einer Pipette resuspendiert. Die entstandene Zellsuspension wurde mit dem oben genannten Anzuchtmedium auf 200 ml aufgefüllt. Je 60 ml wurden in eine neue Gewebekulturflasche (550 ml) gegeben und bei 28 °C im Brutschrank gelagert. Die Zellen wurden erneut umgesetzt, sobald sich ein dichter Zellrasen gebildet hatte (nach ca. einer Woche).

### **3.17 Anzüchtung der Virusisolate / Ranavirusnachweis mittels TH-1-Zellkultur**

Organproben gestorbener Tiere bzw. Rachen- oder Kloakentupferproben noch lebender Tiere wurden mittels TH-1-Zellkultur auf das Vorhandensein von Ranaviren untersucht. Die Virusisolate wurden aus Organproben gestorbener Tiere gewonnen. In beiden Fällen wurde dieselbe Vorgehensweise angewendet.

Die Organproben wurden einzeln mit sterilem Seesand in einem Mörser unter der Zugabe von MEM oder PBS angerieben. Trockenen Tupfern wurde 1 bis 2 ml MEM oder PBS hinzugefügt.

Die in beiden Fällen erhaltene Suspension wurde für drei Minuten im Ultraschallbad beschallt. Enthielt die Suspension viele Schwebstoffe, wurde sie durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 2.000 U/min (867 x g) geklärt. Die Suspension bzw. der Überstand wurde durch einen Glasfaserfilter und einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,2 µm filtriert, um Bakterien, Gewebstrümmer und andere Verunreinigungen zu entfernen.

0,5 ml der erhaltenen Virussuspension wurden mit 1 ml TH-1-Zellsuspension in ein Well einer 24-Well-Platte gegeben. Die Platten wurden sechs Tage bei 28 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden täglich lichtmikroskopisch (100-fache Vergrößerung) auf das Entstehen von zytopathischen Effekten kontrolliert. War nach sechs Tagen noch kein cpE zu sehen, wurden die Platten eingefroren, aufgetaut und 0,5 ml der Suspension für eine zweite Passage auf neu subkultivierte TH-1-Zellkulturplatten verimpft.

### 3.18 Endpunkt-Titration

Um die Virusisolate zu klonieren, wurde eine zweifache Endpunkt-Titration durchgeführt.

Erhaltene Virusisolate wurden bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, aufgetaut und anschließend durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,2\text{ }\mu\text{m}$  filtriert. Die erhaltene Suspension wurde mit Anzuchtmedium in Zehnerpotenzen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-10}$  verdünnt. In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je Well  $25\text{ }\mu\text{l}$  bzw. für die Zellkontrolle  $50\text{ }\mu\text{l}$  Anzuchtmedium vorgelegt. Anschließend wurden je vier Wells mit jeweils  $25\text{ }\mu\text{l}$  derselben Virus-Verdünnungsstufe befüllt. Danach erfolgte eine Zugabe von  $50\text{ }\mu\text{l}$  TH-1-Zellen gelöst in Anzuchtmedium.

Die Platten wurden bei  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einem  $\text{CO}_2$ -Begasungsbrutschrank inkubiert und täglich mikroskopisch auf das Auftreten eines cpE kontrolliert. Nach Kultivierung für 13 Tage wurde die höchste Verdünnungsstufe, bei der nur ein herdförmiger zytopathischer Effekt aufgetreten war, geerntet, in einer zweiten Endpunkt-Titration weiter kloniert und für alle folgenden Charakterisierungen verwendet.

### 3.19 Vermehrung der Virusisolate

Die durch die zwei Endpunkt-Titrationen klonierten Isolate wurden in TH-1-Zellkulturen vermehrt, um genügend große Mengen von jedem Virusisolat für die folgenden Untersuchungen zu gewinnen.

Dazu wurden die klonierten Isolate in ein Well einer 24-Well-Platte verimpft. Sobald sie dort großflächig einen zytopathischen Effekt zeigten (gegebenenfalls durch erneutes Umsetzen in eine 24-Well-Platte), wurden sie eingefroren, um die Viruspartikel aus den Zellen zu befreien. Nach einem Tag bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  wurden die Platten aufgetaut und die Isolate in eine  $50\text{ ml}$  Gewebekulturflasche verimpft. War auch hier ein großflächiger cpE entstanden, wurden die Isolate nach erneutem Einfrieren und Auftauen in eine  $550\text{ ml}$  Gewebekulturflasche verimpft. Die Virussuspension wurde durch Einfrieren und anschließendes Auftauen geerntet. Durch fünfminütige Zentrifugation bei  $2.000\text{ U/min}$  ( $867 \times g$ )

wurden die Zellen abgetrennt und der zellfreie virushaltige Überstand gewonnen.

Die Virussuspension wurde nach dem Prinzip der Endpunkt-Titration (s. Punkt 3.18) in eine 96-Well-Platte aufgetragen. Nach sechs Tagen wurde die Zellkultur mikroskopisch beurteilt und die  $KID_{50}$  je 25  $\mu$ l Inokulum nach der Berechnungsformel von SPEARMAN und KAERBER (MAYR et al., 1974) bestimmt. Die  $KID_{50}$  je 25  $\mu$ l wurde auf die  $KID_{50}$  je ml umgerechnet. Die Virussuspension wurde in 1 ml Portionen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 3.20 Chloroformtest

Anhand der Ergebnisse des Chloroformtests können behüllte von unbehüllten Viren unterschieden werden (MAYR und BÖGEL, 1961). Durch die Zugabe von Chloroform wird bei behüllten Viren die Lipidhülle zerstört, wodurch sie ihre Infektiosität verlieren. Unbehüllte Viren bleiben unbeeinflusst von der Zugabe von Chloroform und bleiben somit weiter infektiös.

1,8 ml Virussuspension wurde mit 0,2 ml Chloroform p. a. versetzt und eine Stunde lang bei Zimmertemperatur geschüttelt. Die Probe wurde bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Kühlschrank stehen gelassen. Nach einem Tag wurde die Probe 30 min bei 3.000 U/min ( $1.952 \times g$ ) zentrifugiert, wodurch sich drei Schichten bildeten. Die untere Schicht bestand aus Chloroform mit den darin gelösten lipophilen Substanzen (z. B. die Lipidhülle der Viren). Die mittlere Schicht enthielt ausgefällte Proteine. Die obere wässrige, virushaltige Schicht wurde abgenommen, in Zehnerpotenzen verdünnt und unter Zugabe von TH-1-Zellen in eine 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Zur Kontrolle wurde unbehandeltes Virus ebenfalls in Zehnerpotenzen verdünnt und mitgeführt.

Während der nächsten sechs Tage wurden die Zellkulturen mittels Lichtmikroskop auf die Ausbildung eines zytopathischen Effekts untersucht und beurteilt. Liegt ein behülltes Virusisolat vor, so wird dessen Infektiosität vollständig zerstört, während die Infektionstiter der nicht behüllten Virusisolate im Vergleich zur nicht mit Chloroform behandelten Kontrolle nahezu unbeeinflusst bleiben.



### 3.21 5-Iod-2-Desoxy-Uridin-Test

Der 5-Iod-2-Desoxy-Uridin-Test eignet sich zur Bestimmung des Nukleinsäuretyps von Viren. 5-Iod-2-Desoxy-Uridin (IUDR) ist ein Thymidin-Analogon und führt durch seinen Einbau zu einem Abbruch der DNA-Synthese (PRUSOFF, 1960). Somit kann durch die Zugabe von IUDR die Replikation von DNA-Viren gehemmt werden. RNA-Viren bleiben von diesem Effekt unbeeinflusst. Da IUDR auch die DNA-Synthese der Zellen hemmt, müssen für diesen Test ausgewachsene Zellkulturen verwendet werden (HAAS und MAASS, 1964).

In jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 50  $\mu$ l TH-1-Zellen gegeben und im Brutschrank bebrütet. Nachdem die Zellen nach einer Bebrütungszeit von ca. sechs Tagen zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen waren, wurde in jedes Well 50  $\mu$ l Virussuspension, die vorher in Zehnerpotenzen von  $10^{-1}$  bis  $10^{-10}$  verdünnt wurde, pipettiert. Nach einer zweistündigen Inkubation bei 28 °C wurde das Inokulat abgesaugt. Je vier Vertiefungen der gleichen Verdünnungsstufe wurden mit 100  $\mu$ l Medium (MEM mit 20 % FKS, 1 % Gentamycin und 1 % Amphotericin B), welches IUDR (50  $\mu$ g/ml) enthält, bzw. zur Kontrolle mit 100  $\mu$ l Medium ohne IUDR aufgefüllt.

Während der nächsten sechs Tage wurden die Platten täglich mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf das Auftreten eines cpE untersucht. Ein Virusisolat wurde dann als DNA-Virus angesprochen, wenn mindestens eine Reduktion des Infektionstiters von zwei Zehnerpotenzen erreicht worden ist. Handelt es sich um ein RNA-Virus, so wird keine Reduktion des Virustiters erwartet.

### 3.22 Filtration

Virussuspensionen wurden, bevor sie in Zellkultur inokuliert wurden, durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,2  $\mu$ m bzw. 0,45  $\mu$ m (s. Punkt 4.14) filtriert, um Bakterien, Gewebstrümmer und andere Verunreinigungen, die die Auswertung der Zellkultur verhindern würden, zu entfernen (s. Punkt 3.17). Um zu überprüfen, inwieweit die Menge der Viruspartikel in der Suspension durch die Filtration beeinflusst wird, wurde folgender Versuch durchgeführt: Virussuspension (Isolat 5810/07) mit bekannter  $KID_{50}$  wurde durch einen Filter mit

einer mittleren Porenweite von 0,2 µm bzw. 0,45 µm filtriert. Anschließend wurden die beiden filtrierten Suspensionen, wie unter Punkt 3.18 beschrieben, auf Zellkulturplatten aufgebracht und nach sechs Tagen die  $KID_{50}$  berechnet (s. Punkt 3.19).

### **3.23 Virusvermehrung in verschiedenen Zellkulturen bei 28 °C und 37 °C**

Dieser Versuch diente der Untersuchung der Vermehrung von Ranaviren in Abhängigkeit von der angebotenen Zellkultur und der Bebrütungstemperatur.

Es wurden acht verschiedene Zelllinien (s. Punkt 3.2) bei jeweils 28 °C und 37 °C eingesetzt. Zwei Zelllinien stammen ursprünglich aus Reptilien: TH-1 (Terrapene Heart Zellen) und VH2 (Viper Heart Zellen). Die verbliebenen sechs Zelllinien sind Säugetierzelllinien: SFT (Schaf Thymus Zellen), Na (Maus Neuroblastom Zellen), MDBK (Madin-Darby Bovine Kidney Zellen), BGM (Buffalo Green Monkey Kidney Zellen), BHK (Baby Hamster Kidney Zellen) und KOP (Rind Ösopharynxgewebe Zellen). Diese Zelllinien wurden ausgewählt, weil sie trotz der verwendeten suboptimalen Bebrütungstemperatur ein konstantes oder nur leicht eingeschränktes Wachstum bei gleich bleibender Zellmorphologie zeigten.

Die Reptilienzellen werden bei 28 °C in Anzuchtmedium, welches aus MEM mit 20 % FKS, 1 % Gentamycin und 1 % Amphotericin B besteht, gezüchtet und einmal pro Woche auf neue Gewebekulturflaschen umgesetzt. Die Säugetierzellen werden in einem Anzuchtmedium, welches aus MEM mit 10 % FKS, 1 % Gentamycin und 1 % Partricin besteht, bei 37 °C gehalten. SFT und KOP werden einmal pro Woche, die verbleibenden Zelllinien zweimal pro Woche subkultiviert. Das Umsetzen der VH2 erfolgt wie bereits vorher in Kultivierung von TH-1-Zellen beschrieben (s. Punkt 3.16). Die Säugetierzellen werden im Gegensatz dazu mit 30-50 ml 0,05 %iger Trypsin-PBS-Versen-Lösung bis zum Ablösen der Zellen vom Flaschenboden (1,5 bis 10 min) trypsinisiert. Anschließend werden sie ohne vorheriges Mischen, da sie empfindlicher als die Reptilienzellen sind, zentrifugiert. Je nach Wachstumsrate der Zellen wird das Verhältnis Zellen zu Anzuchtmedium entsprechend gewählt.

Je eine Flasche der verschiedenen Zelllinien, die als Ausgangsmaterial für die Passage bei der suboptimalen Temperatur diente, wurde vor dem Versuchsbeginn zur Temperaturanpassung für eine Passage bei 28 °C (Säugetierzellen) bzw. 37 °C (Reptilienzellen) gehalten. Dabei war es von Vorteil, den im Anzuchtmedium enthaltenen FKS-Anteil zu verdoppeln, wodurch die Zellen die Temperaturveränderung besser überstanden. Je nach Wachstum wurden die Dauer einer Passage und das Verhältnis Zellen zu Anzuchtmedium gegenüber denen bei Optimaltemperatur verändert.

Nach Entstehen eines dichten Zellrasens wurden die Zellen umgesetzt, wobei jeweils 10 ml der entstandenen Zellsuspension auf eine 50 ml Gewebekulturflasche gegeben wurde. Bei unter suboptimaler Temperatur gehaltenen Zellen wurde bei verzögertem Wachstum nur bis zum Entstehen eines annähernd kompletten Zellrasens gewartet. Je eine Flasche wurde mit 1 ml Virussuspension beimpft. Es wurden niedrige Titer (Virustiter  $10^{3,6}$  bis  $10^{5,1}$  KID<sub>50</sub> je ml) gewählt, um die Möglichkeit zu einer starken Virusvermehrung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Flaschen bei der schon vorher gehaltenen Temperatur inkubiert. Nach sechs Tagen wurden die Zellen beurteilt, eingefroren, aufgetaut und für eine zweite Passage auf neue Zellen verimpft. Nach weiteren sechs Tagen wurden die Zellen wiederum beurteilt, eingefroren und aufgetaut. Die anschließende Titerbestimmung erfolgte nach dem bereits vorher beschriebenen System auf TH-1-Zellen bei 28 °C (s. Punkt 3.19).

### **3.24 Hämagglutinationstest**

Manche Viren binden an spezifische Rezeptoren auf der Oberfläche von Erythrozyten und bilden dadurch netzartige Virus-Erythrozyten-Anordnungen. Somit kann das betreffende Virus durch die sichtbare Agglutination der Erythrozyten nachgewiesen werden (BÜTTNER, 2002).

#### *Hühnererythrozyten*

Bei örtlichen Hühnerschlachtungen im Kreis Lippe wird Hühnerblut gewonnen und mit Alseverscher Lösung versetzt.

Zum Waschen der Erythrozyten wurden 10 ml Hühnerblut mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Dieses Gemisch wurde bei 3.000 U/min (1.952 x g) für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Nun wurde erneut PBS aufgefüllt, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und erneut zentrifugiert. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis der Überstand nach der Zentrifugation klar blieb (meist nach zwei bis drei Waschvorgängen). Aus den pelletierten Erythrozyten wurde eine 0,5 %ige Suspension gebildet, indem 19,9 ml PBS mit 0,1 ml der gewaschenen Erythrozyten gemischt wurden.

In jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte (V-Form) wurden 25 µl PBS vorgelegt. In je ein Well der obersten Reihe wurden 25 µl des auf Hämagglutination zu prüfenden Virus zugegeben und anschließend in Zweierpotenzen verdünnt. Eine Spalte ohne Viruszugabe wurde als Erythrozytenkontrolle zum Ausschluss der Selbstagglutination mitgeführt. In jedes Well wurden 50 µl der 0,5 %igen Erythrozytensuspension gegeben. Nach dreißigminütiger Inkubation bei Zimmertemperatur wurde der Test nach Schrägstellen der Platten abgelesen. Die Agglutination von Erythrozyten führt zu einer diffusen, netzartigen Ablagerung von Erythrozyten, die auch bei Schräghaltung der Platten bestehen bleibt. Bei fehlender Agglutination bildet sich ein Erythrozytenknopf, der beim Schrägstellen der Platten tropfenförmig herunterläuft. Der Hämagglutinationstiter eines Virus entspricht der höchsten Virusverdünnung in  $\log_2$ , bei der noch eine vollständige Hämagglutination sichtbar ist.

#### *Humanerythrozyten*

Die Humanerythrozyten (Blutgruppe 0, Blutbank Krefeld) wurden analog zu den Hühnererythrozyten gewaschen (s.o.). Anschließend wurde eine 1 %ige Suspension durch Zugabe von PBS gebildet. In jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte (V-Form) wurden 25 µl PBS vorgelegt. In je ein Well der obersten Reihe wurden 25 µl Virus zugegeben und anschließend in Zweierpotenzen verdünnt. Eine Spalte ohne Viruszugabe wurde als Erythrozytenkontrolle zum Ausschluss der Selbstagglutination mitgeführt. In jedes Well wurden 25 µl der 1 %igen Erythrozytensuspension gegeben. Nach zwei- bis vierstündiger Inkubation bei 4 bis 8 °C wurde der Test durch Schrägstellen der Platten abgelesen.

Die Bewertung der Hämagglutinationstiter erfolgte wie bei den Erythrozyten von Hühnern.

### 3.25 Neutralisationstest

Seren mit neutralisierenden Antikörpern sind in der Lage, Antigen, d. h. in diesem Fall Virus, zu binden und dadurch das Entstehen eines cpE in einer Zellkultur zu verhindern (BÜTTNER, 2002).

Alle Seren wurden vor der Untersuchung für 30 min bei 56 °C im Wasserbad erhitzt, um im Serum ggf. enthaltene unspezifische Inhibitoren zu zerstören. In jedes Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 25 µl Anzuchtmedium vorgelegt. Danach wurde in je zwei Wells 25 µl Serum zugegeben und in Zweierpotenzen (1:2 bis 1:1.024) verdünnt. Nun wurden 25 µl Testvirus (Gebrauchssuspension mit 100 KID<sub>50</sub> je 25 µl) zugegeben. Eine Reihe ohne Zugabe von Serum und ohne Testvirus diente als Zellkontrolle. Zusätzlich wurden als Viruskontrolle die Gebrauchsverdünnung und die drei folgenden Virusverdünnungen in Zehnerpotenzen zur Kontrolle der KID<sub>50</sub> ohne Zugabe von Serum mitgeführt.

Es wurden vier verschiedene Virussuspension-Serum-Inkubationen vergleichend durchgeführt. Ein Ansatz (A) wurde 24 h bei 28 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Der zweite Ansatz (B) wurde für 24 h bei 37 °C, der dritte Ansatz (C) für 1 h bei 28 °C inkubiert. Der vierte Ansatz (D) wurde angelehnt an die Methode von CHINCHAR *et al.* (1984) 2 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurde zu diesem Ansatz 10 µl eines sekundären Antikörpers (Maus-anti-Schildkröten-Antikörper HL1546) hinzugefügt und für 1 h bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurde allen Ansätzen 50 µl TH-1-Zellen zugefügt und die Platten bei 28 °C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bebrütet.

Täglich wurden die Platten über einen Zeitraum von sechs Tagen lichtmikroskopisch auf das Auftreten eines cpE kontrolliert. Das Ergebnis eines Neutralisationstests ist valide, wenn die Virusgebrauchsverdünnung (Viruskontrolle) einen deutlichen cpE hervorruft und einen Titer von 10<sup>2</sup> aufweist. Weil bisher keine Spezifitätsgrenzen von Seren mit Antikörpern gegen das Ranavirus publiziert worden sind, wird der Titer in log<sub>2</sub> der höchsten neutralisierenden Serumverdünnung angegeben.

**Tabelle 8:** Getestete Seren, verwendete Virusisolate sowie methodische Variationen der Virus-Serum-Inkubation der durchgeführten Neutralisationstests

Getestete Seren	Verwendete Ranavirusisolate					
	5810	5187	6172	4152	882	CU60
F2.1	A					
B1.1	A					
B1.2	A					
B1.3	A					
B1.4	A					
B1.5	A					
B1.6	A					
B1.7	A					
B1.8	A					
B1.9	A					
B1.10	A					
B1.11	A					
B1.12	A					
B1.13	A&D					
B1.14	A					
B1.15	A					
B1.16	A	B		B		
B1.17	A					
B1.18	A					
F3.1	A					
F3.2	A					
F3.3	A					
F3.4	A					
F3.5	A					
F3.6	A	B		B		
F3.7	A					
M1.1		B	A	A&B		
M1.2	D		A	A		
E1.1			A			
E1.2			A			
E1.3			A			
E1.4			A			
E1.5			A			
E1.6			A			
E1.7			A			
E1.8			A			
E1.9			A			
E1.10			A			
E1.11			A			
E1.12			A			
E1.13			A			
E1.14			A			
E2.1	A&C			A	C	
E2.2	A&C	B		A&B	C	
E2.3	A&B			A	C	
M2.1					A,B,C,D	A,B,C,D
G2	C					
G3	C					
K2	C					

Legende:

A: Virussuspension-Serum-Inkubation 24 h bei 28 °C

B: Virussuspension-Serum-Inkubation 24 h bei 37 °C

C: Virussuspension-Serum-Inkubation 1 h bei 28 °C

D: Virussuspension-Serum-Inkubation 2 h bei 28 °C, Zugabe sekundärer Antikörper mit nachfolgender Inkubation 1 h bei 28 °C

Zusätzlich wurde ein modifizierter Neutralisationstest durchgeführt (s. MANIERO et al., 2006). Hierzu wurden 150 µl Serum (G3) mit 150 µl Virussuspension (CU60/09) gemischt und für eine Stunde bei 28 °C bzw. auf Eis inkubiert. Als Kontrolle wurden 150 µl Virussuspension (CU60/09) mit 150 µl Anzuchtmedium gemischt und damit ebenso verfahren wie mit der Serum-Virus-Suspension. Anschließend wurde die Virus-Serum-Suspension und die Kontrolle auf TH-1-Zellkulturplatten austitriert (s. Punkt 3.18) und nach sechs Tagen die KID<sub>50</sub> berechnet (s. Punkt 3.19). Bei einer deutlichen Reduktion der KID<sub>50</sub> nach der Inkubation mit dem Serum im Vergleich zu der Kontrolle wird von einer neutralisierenden Aktivität des Serums gesprochen.

### 3.26 Enzym-linked immunosorbent assay

Der in diesem ELISA eingesetzte sekundäre Antikörper HL1546 wurde freundlicherweise von Frau Prof. Mary B. Brown, Department of Infectious Diseases and Pathology, College of Veterinary Medicine, University of Florida, Gainesville, USA, zur Verfügung gestellt. Diese hatte ihn von der Mycoplasma Research Group der University of Florida erhalten. Der Antikörper war ursprünglich von ORIGGI et al. (2001) hergestellt worden.

Dieser Antikörper bindet an Antikörper von *Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, *Testudo horsfieldii* (ORIGGI et al., 2001), *Testudo kleinmanni* und *Indotestudo elongata* (BROWN, persönliche Mitteilung). Er bindet unter anderem jedoch keine Antikörper von Schildkröten der Spezies *Testudo marginata*, *Terrapene carolina* und *Geochelone sulcata* (BROWN, persönliche Mitteilung).

Somit standen insgesamt 227 Seren zur Verfügung, die mit Hilfe des ELISA auf Antikörper getestet werden konnten. 182 dieser Seren stammten von *Testudo hermanni*, 41 Seren von *Testudo graeca* und vier Seren von *Indotestudo elon-*

*gata*. 121 dieser Seren stammen aus Beständen mit Schildkröten, in denen bereits Erkrankungen nach Infektionen mit Ranaviren aufgetreten waren. Die verbleibenden 106 Seren sind ursprünglich zur Untersuchung auf Antikörper gegen Schildkrötenherpesvirus eingeschickt worden.

Zu Beginn meiner Untersuchungen standen keine Seren mit bekanntem Gehalt an Antikörpern gegen Ranavirus zur Verfügung. Daher wurde als Positivkontrolle Serum von Schildkröte „Gertrude“, die in Folge einer Ranavirusinfektion schwer erkrankt war und die Erkrankung überlebt hatte, eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden Seren von klinisch gesunden Schildkröten ohne bekannte vorherige Erkrankung verwendet. Nach der Entwicklung des ELISA und der somit entstandenen Möglichkeit zum Antikörpernachweis wurden auch andere Seren, entsprechend dem vorherigen Ergebnis, als Kontrollen genutzt.

Es wurden zwei verschiedene Viren im ELISA eingesetzt, um eventuell vorhandene antigenetische Divergenzen aufzudecken. Zum einen wurde Virus CU60/09 eingesetzt. Dieses stammt aus einem Bestand, aus dem viele Seren eingesandt wurden. Zum anderen wurde Virus 882/96 verwendet. Dieses Virus wurde von einer Schildkröte isoliert, die schon 1996 an den Folgen einer Ranavirusinfektion gestorben war. Virus 882/96 hatte in der Restriktionsenzymanalyse die meisten von den anderen Schildkrötenviren abweichenden Banden gezeigt.

In 550 ml Gewebekulturflaschen wurden TH-1-Zellen bzw. mit Virus 882/96 oder Virus CU60/09 infizierte TH-1-Zellen vermehrt. Zu dem Zeitpunkt, zu welchem die infizierten Zellen erste zytopathische Effekte zeigten und sich somit nicht weiter vermehrten, wurden die nicht-infizierten Zellen bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren, um Kontrollansätze mit einer entsprechenden Zellmenge zu erhalten. Die virushaltigen Ansätze wurden eingefroren, sobald der komplette Zellrasen zerstört war. Durch Auftauen, erneutes Einfrieren und Auftauen wurde Virus aus den Zellen freigesetzt. Mit den nicht-infizierten Kontrollansätzen wurde ebenso verfahren wie mit den infizierten Zellkulturen. Durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 5.000 U/min ( $5.422 \times g$ ) wurden die Zellen abgetrennt. Je 20 ml des Überstandes wurden in einer Ultrazentrifuge bei 30.000 U/min ( $108.763 \times g$ ) für zwei Stunden zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde in 2 ml PBS<sub>E</sub> resuspen-



diert. Je 10 ml der erhaltenen Suspension wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation in 30 %iger Saccharose (gelöst in PBS<sub>E</sub>) bei 36.000 U/min (156.619 x g) für zwei Stunden von Verunreinigungen befreit. Das erhaltene Pellet wurde in 3 ml PBS<sub>E</sub> suspendiert.

Von den beiden erhaltenen Suspensionen, Virus- und Kontrollsuspension, wurde die KID<sub>50</sub> (s. Punkt 3.19) sowie der Proteingehalt bestimmt. Die Bestimmung des Proteingehaltes geschah nach der Methode von BRADFORD (1976).

Angelehnt an die Methode von JOHNSON et al. (2007) wurde im Rahmen dieser Arbeit der nachfolgend beschriebene ELISA entwickelt. Zu Beginn der Untersuchung wurde Virus 882/96 eingesetzt. Mit diesem Virus wurden verschiedene Virus-, Serum-, Antikörper- und Enzymkonzentrationen sowie verschiedene Puffer und Inkubationstemperaturen getestet.

Die in Tabelle 9 dargestellten Verdünnungen der Virussuspension, des Serums, des sekundären, biotinierten Antikörpers sowie der an Streptavidin gebundenen Alkalischen Phosphatase wurden in verschiedenen Kombinationen geprüft.

**Tabelle 9:** Verdünnungen der im ELISA eingesetzten Komponenten

ELISA-Komponenten	Verdünnungen
Virussuspension	1:10, 1:15, 1:20, 1:30
Serum	1:10, 1:100
sekundärer Antikörper	1:1.000, 1:10.000
Alkalische Phosphatase	1:250, 1:500, 1:5.000

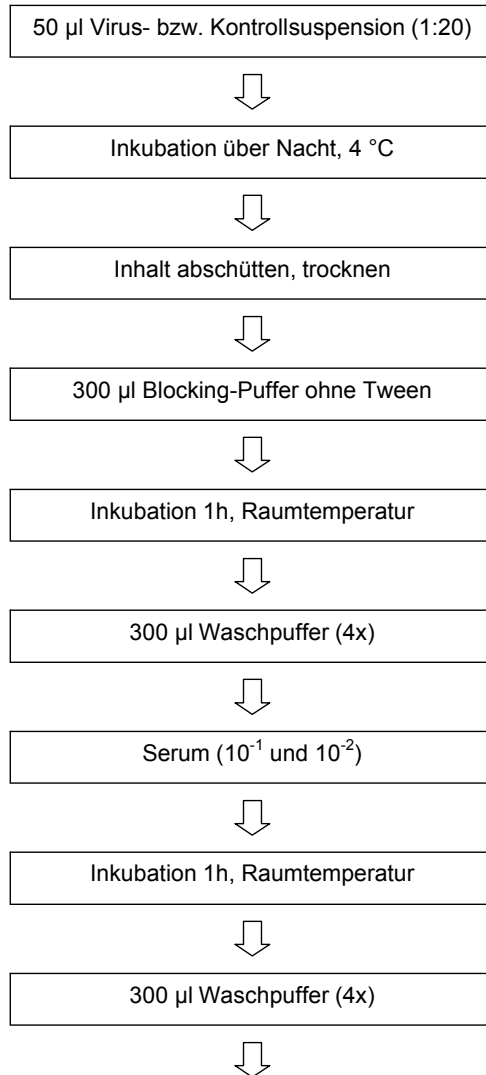
In der Methode von JOHNSON et al. (2007) werden auf PBS basierende Puffer zum Verdünnen, Blocken und Waschen eingesetzt. Um eine mögliche Hemmung der Alkalischen Phosphatase durch das im Puffer vorhandene Phosphat auszuschliessen, wurde der Test ebenfalls mit auf TBS basierenden Puffern durchgeführt. Zusätzlich wurde getestet, ob sich durch Vermeidung des Einsatzes von Tween vor dem Blocken der ELISA-Platten bessere Ergebnisse erzielen lassen. KLEY (2003) beschrieb, dass durch Verwendung von Tween-haltiger Waschlösung vor dem Blocken und eines Magermilchpuffers mit Tween höhere unspezifische Hintergrundreaktionen zu messen waren, als wenn der Inhalt der

Platten entfernt und die Platten ohne einen vorherigen Waschschrift mit Magermilchpuffer ohne Tween geblockt wurden.

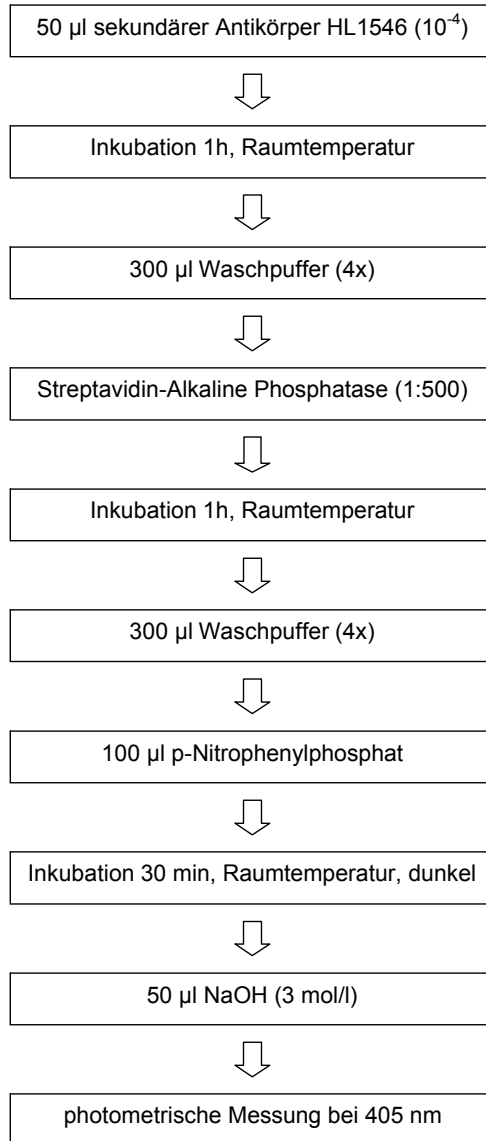
Es wurden verschiedene Inkubationstemperaturen getestet. Dazu wurden jeweils gleich beschichtete und behandelte ELISA-Platten bei Raumtemperatur, bei 21 °C, bei 28 °C, bei 30 °C und bei 37 °C inkubiert.

Die aus diesen Versuchen erhaltenen Ergebnisse wurden ausgewertet und daraufhin folgender ELISA für die Untersuchungen ausgewählt: Virus- und Kontroll suspension wurden 1:20 mit PBS/A verdünnt. Jeweils 50 µl der Virus- bzw. Kontroll suspension wurden in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Dabei wurde jeweils eine Reihe mit der Kontroll suspension und jeweils zwei Reihen mit der Virussuspension befüllt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Inhalt der Platten entfernt und die Platten auf Zellstoff trocken geklopft. Anschließend wurde jedes Well mit 300 µl Blocking-Puffer ohne Tween befüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blocking-Puffer wurde entfernt und die Platten wie folgt gewaschen: Jedes Well wurde mit 300 µl Waschpuffer befüllt, der Waschpuffer wurde entfernt, und die Platten wurden auf Zellstoff trocken geklopft. Dieser Vorgang wurde insgesamt viermal ausgeführt, wobei beim zweiten Waschschrift der Waschpuffer für mindestens zwei Minuten auf der Platte belassen wurde. Ein Positivserum, drei Negativ- und die zu untersuchenden Seren wurden mit Blocking-Puffer auf  $10^{-1}$  und  $10^{-2}$  verdünnt. Von jeder der beiden Verdünnungen wurden jeweils 50 µl in jeweils drei Wells (ein Kontrollwell und zwei Viruswells) gefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgte der oben beschriebene Waschschrift. In jedes Well wurden 50 µl des sekundären, biotinierten Antikörpers HL1546 ( $10^{-4}$  mit Blocking-Puffer verdünnt) gefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Platte wie oben beschrieben gewaschen. 50 µl der an Streptavidin gebundenen Alkalischen Phosphatase (1:500 in PBS/A verdünnt) wurden in jedes Well gefüllt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem viermaligen Waschschrift wurde jedes Well mit 100 µl p-Nitrophenylphosphat befüllt und bei Raumtemperatur an einem dunklen Ort inkubiert. Nach 30 min wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl NaOH (3 mol/l) gestoppt. Die optische Dichte (OD)

der einzelnen Wells wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm gemessen.



**Abbildung 7:** Flussdiagramm zur Durchführung des ELISA



**Abbildung 7:** Fortsetzung

Jedes Serum wurde dreifach (ein Kontrollwell und zwei Viruswells) getestet. Aus den beiden OD-Werten der Viruswells wurde der arithmetische Mittelwert gebildet und durch die OD des Kontrollwells dividiert, um jegliche Hintergrundbindung an die Zellen abziehen.

Da es sich bei diesem ELISA um ein noch nicht standardisiertes Testsystem handelt, wurden verschiedene Qualitätsparameter untersucht, um die Qualität dieses serologischen Testsystems festzustellen. Dazu wurden die Intra-Assay-Präzision, die Inter-Assay-Präzision sowie die Überprüfung der Verdünnungsechtheit herangezogen. Im Verlauf der Untersuchung wurde der Cut-off-Wert festgelegt.

Es wurden 227 Seren auf Ranavirus-spezifische Antikörper getestet. Von einigen Schildkröten standen mehrere, mit zeitlichem Abstand gewonnene Seren zur Verfügung, so dass ein erster Eindruck von der Entwicklung der Antikörpertiter im zeitlichen Verlauf gewonnen werden konnte. Knapp die Hälfte der Seren stammt aus Beständen, in denen bisher keine Erkrankungen nach Infektion mit Ranaviren nachgewiesen wurden. Diese Seren wurden untersucht, um einen Überblick über die Verbreitung von Ranavirus-spezifischen Antikörpern in deutschen Schildkrötenbeständen zu erlangen. Einige Seren mit im Neutralisationstest nachgewiesenen Herpesantikörpern wurden ebenfalls untersucht, um Kreuzreaktionen mit Ranavirus auszuschließen.

### **3.27 Polymerasekettenreaktion**

#### *DNA-Extraktion*

Mit Hilfe des DNA-Extraktionskits NucleoSpin® Tissue von Machery-Nagel wurde die virale DNA nach dem Prinzip einer Anionenaustauschersäule extrahiert. Alle verwendeten Puffer waren in dem NucleoSpin® Tissue-Extraktionskit enthalten. Zur Überprüfung der korrekten DNA-Isolierung wurden Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Es wurden 100 µl Probenmaterial mit 180 µl Lysispuffer T1 und 25 µl Proteinase K in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und ein bis drei Stunden bei 56 °C inkubiert.

Danach wurden 200 µl Bindungspuffer B3 hinzugefügt, die gesamte Probe gemischt und zehn Minuten bei 70 °C inkubiert.

Die Fällung der DNA erfolgte durch Zufügen von 260 µl Ethanol (96 %). Nach dem Mischen wurde die gesamte Flüssigkeit in eine NucleoSpin® Tissue Säule überführt, die sich in einem 2 ml Zentrifugen-Auffanggefäß befand. Bei der anschließenden Zentrifugation (eine Minute bei 14.000 U/min (11.000 x g)) wurde die DNA an die in der Säule befindliche Silikat-Membran gebunden.

Die NucleoSpin® Tissue Säule wurde in ein neues Auffanggefäß umgesteckt, und es wurden 500 ml Waschpuffer BW hinzugegeben. Anschließend folgte eine einminütige Zentrifugation bei 14.000 U/min (11.000 x g).

Die Säule wurde wiederum in ein neues Auffanggefäß umgesteckt, und es wurden 600 ml Waschpuffer B5 hinzugegeben. Es folgte eine Zentrifugation für eine Minute bei 14.000 U/min (11.000 x g).

Zum vollständigen Entfernen der verbliebenen Flüssigkeit wurde die Säule auf ein neues Auffanggefäß umgesteckt und für eine Minute bei 14.000 U/min (11.000 x g) zentrifugiert.

Zur Elution der DNA wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß umgesetzt und 100 µl auf 70 °C erwärmter Elutionspuffer BE hinzugegeben. Nach mindestens einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch Zentrifugation für eine Minute bei 14.000 U/min (11.000 x g) eluiert. Die DNA wurde durch einminütiges Erhitzen auf 95 °C denaturiert.

Die anschließende Lagerung erfolgte bei 4 °C oder bei einer Lagerung von mehr als 24 Stunden bei -20 °C.

### *PCR*

Die folgenden Arbeitsschritte erfolgten während der Lagerung der Proben und Reaktionsflüssigkeiten auf Eis, um Fehlhybridisierungen oder die Bildung von Primerdimeren zu verhindern. Zur Überprüfung des korrekten PCR-Ablaufes wurden zusätzliche Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Zuerst wurde je Probe 2 x 45 µl Mastermix hergestellt. Dazu wurden je 5,00 µl PCR-Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,00 µl dNTP-Lösung (2,5 mM je dNTP), 2,00 µl Primer FV-3-MCP 4 (0,01 nmol/µl, 5'-GAC TTG GCC ACT TAT

GAC-3'), 2,00 µl Primer FV-3-MCP 5 (0,01 nmol/µl, 5'-GTC TCT GCA GAA GAA GAA-3'), 0,25 µl Polymerase (entspricht 1,25 U/Reaktion) und 33,75 µl RNA-/DNA-freies Wasser in ein 0,2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Es wurden zu je 45 µl Mastermix 5 µl Probe hinzugegeben. Dabei wurde die Probe einmal unverdünnt und einmal in der Verdünnung  $10^{-1}$  eingesetzt. Die Proben wurden gemischt und zentrifugiert, um zu verhindern, dass einzelne Reaktionsbestandteile an den Seitenwänden anhaften.

Die Proben wurden anschließend in den Thermocycler gegeben. Folgendes Temperaturprofil wurde dabei gefahren:

Schritt	Temperatur in °C	Dauer	Vorgang
1	95	2 min	initiale Denaturierung
2	95	30 sec	Denaturierung
3	51	30 sec	Annealing
4	72	30 sec	Elongation
5	72	7 min	finale Elongation
6	4	forever	Lagerung

Schritt 2-4: 35 Zyklen

#### *Agarosegelelektrophorese*

Es wurde ein 1,7 %iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 5,1 g Agarose mit 300 ml Laufpuffer gemischt. Diese Agaroselösung wurde in einer Mikrowelle unter Sichtkontrolle solange bis zum Sieden erhitzt, bis die Flüssigkeit klar war und keine Schlieren mehr erkennbar waren. Die Agaroselösung wurde auf 65 °C abgekühlt, um ein Verformen des Geltablets zu vermeiden. Anschließend wurde ein horizontales, ca. 0,5 cm dickes Gel gegossen. Nach dem Gelieren wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer gegeben, die bis zum Bedecken des Gels mit Laufpuffer gefüllt wurde.

Die Proben wurden zentrifugiert. In die beiden äußeren Taschen wurden 11 µl Marker (100 bp-Leiter) gegeben. Es wurden je 17 µl PCR-Produkt mit 3 µl Auftragepuffer vermischt und in eine Geltasche gegeben. Der Auftragepuffer enthält zum einen Saccharose, welche das spezifische Gewicht der Lösung erhöht,

wodurch diese in die Geltaschen einsinkt, zum anderen die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol, welche die Lauffront farblich markieren. Der Lauf fand bei 100 V (bzw. 110 V für ein Doppelgel) für ca. 80 min statt.

Das Gel wurde 3 min in Ethidiumbromidlösung gefärbt und danach mindestens 20 min in der Entfärberlösung (Laufpuffer) entfärbt. Ethidiumbromid zeigt bei der Anregung mit UV-Licht eine Fluoreszenz. Diese wird, wenn sich Ethidiumbromid-Moleküle in die DNA interkalierten, um den Faktor 50-100 verstärkt. Aufgrund dieser Eigenschaft lassen sich DNA-Banden als helle Bezirke darstellen. Die Beurteilung fand im Dokumentations- und Analysesystem nach einer UV-Belichtung von 1,5-2 sec statt. Das erwartete Ranavirusamplifikat besitzt eine Länge von ca. 500 bp.

### **3.28 PCR-Optimierung**

Zur Optimierung der bereits beschriebenen PCR (MAO et al., 1997, s. Punkt 3.27) wurden verschiedene Faktoren verändert.

Es wurden vier Ranaviren ausgewählt, anhand derer die Sensitivität der modifizierten PCR überprüft wurde. Es wurden das Isolat 882/96, welches im CVUA OWL als Positivkontrolle mitgeführt wird, Isolat 4152/07, Isolat 1834/04 und Isolat 5810/07 verwendet. Diese vier Isolate wurden in Zehnerpotenzen verdünnt, um zu bestimmen, bis zu welcher Verdünnung eine Bande in der ursprünglichen PCR erkennbar ist. Von jedem Isolat wurden drei Verdünnungsstufen eingesetzt, die die Sensitivitätsgrenze enthalten sollten.

Wurde die Menge eines Bestandteils des Mastermix oder der Probe verändert, so wurde der fehlende Anteil mit RNA-/DNA-freiem Wasser ausgeglichen, so dass weiterhin ein PCR-Ansatz aus insgesamt 50 µl entstand. Die Ergebnisse des Elektrophoreselaufs wurden mit der ursprünglichen PCR sowie untereinander verglichen und Änderungen der Sensitivitätsgrenze festgehalten.



Es wurden folgende Veränderungen der ursprünglichen PCR vorgenommen:

Bezeichnung	Veränderung
Z1	ursprüngliche PCR
Z2	ursprüngliche PCR
Z3	ursprüngliche PCR
Z4	0,1 µl dNTPs (2,5 mM je dNTP)
Z5	0,5 µl dNTPs (2,5 mM je dNTP)
Z6	1 µl dNTPs (2,5 mM je dNTP)
Z7	1,5 µl dNTPs (2,5 mM je dNTP)
Z8	2,5 µl dNTPs (2,5 mM je dNTP)
Z9	1,5 µl jedes Primers (0,01 nmol/µl)
Z10	2,5 µl jedes Primers (0,01 nmol/µl)
Z11	3 µl jedes Primers (0,01 nmol/µl)
Z12	30 Zyklen
Z13	40 Zyklen
Z14	Schritt 2 Dauer 1 min
Z15	Schritt 3 Dauer 1 min
Z16	Schritt 4 Dauer 1 min
Z17	3 µl Probe
Z18	7 µl Probe
Z19	0,5 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
Z20	1 µl MgCl <sub>2</sub> (25 mM)
Z21	5 µl Q-Solution
Z22	Annealing Temperaturgradient (49-53 °C)
Z23	Annealing Temperaturgradient (49-53 °C)
Z24	0,1 µl Taq Polymerase
Z25	0,5 µl Taq Polymerase
Z26	ursprüngliche PCR

### 3.29 Restriktionsenzymanalyse

Die zehn Isolate (FV-3, 1834/04, 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07, CU60/09 und 882/96) wurden mit fünf verschiedenen Restriktionsenzymen, MspI, HindIII, XbaI, EcoRI und KpnI, gespalten. Diese fünf Enzyme waren ausgewählt worden, da sie bei der Spaltung von Ranaviren verwertbare Ergebnisse lieferten (LEE und WILLIS, 1983; MAO et al., 1997; MAO et al., 1999; MARSCHANG et al., 1999; HYATT et al., 2000; HYATT et al., 2002; CHINCHAR et al., 2005; MARSCHANG et al., 2005; JOHNSON et al., 2008).

In einem Vorversuch wurden verschiedene Methoden der Virus-DNA-Gewinnung, der Zusammensetzung des Restriktionsansatzes und der Dauer des Elektrophoreselaufs getestet. In einer 550 ml Gewebekulturflasche wurden die gereinigten Virusisolate auf TH-1-Zellen vermehrt. Durch Einfrieren und Auftauen wurde Virus aus den Zellen freigesetzt. Durch fünfminütige Zentrifugation bei 2.000 U/min (867 x g) wurden die Zellen pelletiert, und der virushaltige Überstand konnte gewonnen werden. Die DNA wurde isoliert (s. Punkt 3.27) und in einem Restriktionsansatz eingesetzt. Es zeigten sich jedoch keine oder nur sehr schwache Banden.

Daraufhin wurden zum Aufkonzentrieren der Virussuspension die Zellen einer weiteren 550 ml Gewebekulturflasche mechanisch mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und anschließend durch fünfminütige Zentrifugation bei 2.000 U/min (867 x g) pelletiert. Nach Zugabe von ca. 1 ml PBS zum Zellpellet wurden die Zellmembranen durch Einfrieren und Auftauen zerstört und Virus freigesetzt. Mit Hilfe einer weiteren fünfminütigen Zentrifugation bei 2.000 U/min (867 x g) wurde virushaltiger Überstand gewonnen. Dieser wurde nach der DNA-Isolierung in einem Restriktionsansatz eingesetzt. Es zeigte sich jedoch nur ein unspezifisches Hintergrundsignal.

Zur endgültigen Virus-DNA-Gewinnung wurde wie folgt verfahren: Virushaltige Zellkulturen wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und aufgetaut. Durch zwanzigminütige Zentrifugation bei 5.000 U/min (5.422 x g) wurde virushaltiger Überstand vom Zellpellet getrennt. Der Überstand wurde in einer Ultrazentrifuge zwei Stunden bei 30.000 U/min (108.763 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Viruspellet in einer geringen Menge PBS suspendiert. Diese

Konzentrierung in der Ultrazentrifuge wurde so oft wiederholt, bis sich im Restriktionsansatz deutlich sichtbare Banden zeigten. Zusätzlich wurden mehrere DNA-Extraktionsansätze auf dieselbe NucleoSpin® Tissue Säule gegeben, so dass der DNA-Gehalt der Lösung weiter konzentriert werden konnte.

Zum Ausschluss unspezifischer Banden durch TH-1-Zellen wurde eine nicht infizierte Flasche TH-1-Zellen, wie oben für die virushaltigen Flaschen beschrieben, konzentriert und als Kontrolle im Restriktionslauf mitgeführt.

Als Restriktionsansatz wurden 6,8 µl H<sub>2</sub>O, 2 µl des mitgelieferten Puffers (10-fach konzentriert), 0,2 µl azetyliertes BSA und 1 µl Enzym mit 10 µl Virus-DNA angesetzt. Der Restriktionsansatz wurde gemischt, zentrifugiert und für drei Stunden bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Auf einem 15 x 20 cm großen Geltablett wurde ein 0,7 %iges Agarosegel gegossen (s. Punkt 3.27). Der komplette Restriktionsansatz wurde mit je 3 µl Auftragepuffer gemischt und in die Geltaschen gegeben. Als DNA-Größenmarker wurde ein 1 kbp-Marker sowie der Marker XV mitgeführt. Der Elektrophoreselauf wurde über 16 Stunden bei 40 V durchgeführt. Die Sichtbarmachung der Banden erfolgte wie bereits unter Punkt 3.27 beschrieben.

Anhand der Länge der Laufstrecke der einzelnen Fragmente wurde mit Hilfe der DNA-Marker die Größe der Fragmente geschätzt. Die untersuchten Virusisolate wurden je nach der Anzahl übereinstimmender Fragmente verwandtschaftlich zugeordnet.

### **3.30 Sequenzanalyse**

#### *Vorbereitung*

Die zu untersuchende DNA wurde extrahiert, durch die Amplifikations-PCR vervielfältigt und mittels Gelelektrophorese untersucht (s. Punkt 3.27). Bei einer deutlichen und klaren Einzelbande wurde das PCR-Produkt direkt weiterverwendet. Waren mehrere unspezifische Banden zu sehen, wurde die spezifische Bande mit einer Pasteurpipette ausgestochen und mit ca. 100-500 µl Aqua bidestillata für fünf bis zehn Minuten bei 99 °C erhitzt. 1 µl dieser Lösung wurde in einer erneuten Amplifikations-PCR eingesetzt und das PCR-Produkt wiederum

auf ein Gel aufgetragen. Zeigte sich nun eine spezifische Bande, konnte das PCR-Produkt aus der Reamplifikation verwendet werden.

Das PCR-Produkt wurde mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kits aufgereinigt. Dazu wurden 30 µl des PCR-Produktes mit 150 µl PB-Puffer gemischt. Die erhaltene Lösung wurde auf eine QIAquick® Spin Säule gegeben und für 30 Sekunden bei 13.000 U/min (17.900 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß umgesteckt. Anschließend wurden 750 µl PE-Puffer auf die Säule gegeben und wiederum für 30 Sekunden bei 13.000 U/min (17.900 x g) zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule in ein neues Auffanggefäß umgesteckt. Durch eine einminütige Zentrifugation bei 13.000 U/min (17.900 x g) wurde die verbliebene Flüssigkeit entfernt. Die Säule wurde auf ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß umgesteckt. 50 µl EB-Puffer wurden auf die Säule gegeben und nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur für eine Minute bei 13.000 U/min (17.900 x g) zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen.

Die im Eppendorf Reaktionsgefäß enthaltene Flüssigkeit wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm vermessen, um die DNA-Konzentration zu bestimmen. Die optimale DNA-Menge beträgt 50-80 µg/µl. Zusätzlich wurden bei der Messung zwei Quotienten errechnet. Der Quotient 260/280 gibt die Proteinverunreinigung der Probe an und sollte bei ca. 1,8 liegen. Der Quotient 260/230 zeigt die Salzkonzentration bzw. die Menge organischer Rückstände an und sollte einen Wert von ca. 2 haben.

#### *Sequenzierungs-PCR*

Für ein PCR-Produkt mit einer Länge von 500 bp sollten 10 ng DNA in der Sequenzierungs-PCR eingesetzt werden. Entsprechend der vorher bestimmten DNA-Konzentration wurde die benötigte Menge des PCR-Produkts berechnet. Diese wurde mit 4 µl Premix, 3,2 µl Primer (0,001 nmol/µl), 2 µl Sequencing Buffer und der entsprechenden Menge Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Dabei wurde jedes PCR-Produkt in zwei Ansätze, einer mit Primer FV-3-MCP 4 (5'-GAC TTG GCC ACT TAT GAC-3') und ein zweiter mit Primer FV-3-MCP 5 (5'-GTC TCT GCA GAA GAA GAA-3'), eingesetzt.

Der Reaktionsmix wurde in einen Thermocycler gegeben, und es wurde folgendes Temperaturprofil gefahren:

Schritt	Temperatur in °C	Dauer	Vorgang
1	96	30 sec	Denaturierung
2	51	30 sec	Annealing
3	60	4 min	Elongation
4	4	forever	Lagerung

Schritt 1-3: 25 Zyklen

Zum Entfernen von überschüssigen Dideoxynukleosidtriphosphaten sowie Puffersalzen wurde das Sequenzierungs-PCR-Produkt mit Hilfe des DyeEx<sup>®</sup> 2.0 Spin Kits aufgereinigt. Dazu wurde der Inhalt der DyeEx<sup>®</sup> Spin Säule vorsichtig durchmischt. Der obere Drehverschluss der Säule wurde um eine ¼ Drehung gelöst. Der untere Verschluss der Säule wurde abgeknipst, und die Säule wurde in ein Auffanggefäß gestellt. Nach einer dreiminütigen Zentrifugation bei 2.800 U/min (750 x g) wurde die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß umgesteckt. Der Deckel der Säule wurde verworfen. 10-20 µl des Sequenzierungs-PCR-Produkts wurden vorsichtig in die Mitte des Gelbettes geträufelt, ohne dabei das Gelbett zu berühren. Die Säule wurde für 3 Minuten bei 2.800 U/min (750 x g) zentrifugiert, wobei die Säule in derselben Position in die Zentrifuge gestellt werden musste wie bei der vorherigen Zentrifugation. Die Säule wurde verworfen. Das sich im Eppendorf Reaktionsgefäß befindliche Sequenzierungs-PCR-Produkt wurde bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C bzw. bei einer Lagerung von mehr als 24 Stunden bei -20 °C gelagert.

### *Sequenzierung*

Es wurden jeweils 4 µl des Sequenzierungs-PCR-Produkts mit 20 µl Chromatographie geeignetem Wasser verdünnt und mit Hilfe der 310 Data Collection-Software sequenziert. Anschließend wurden die Ergebnisse mit Hilfe der Sequencing Analysis 5.3.1-Software ausgewertet, wobei der KB Basecaller eingesetzt wurde. Die erhaltene Gensequenz wurde abgesichert, indem beide DNA-

Stränge (forward und reverse) ermittelt und miteinander verglichen wurden. Die Gensequenzen dieses Genomabschnitts sind für die beiden Viren FV-3 und 1834/04 bereits bekannt und in DNA-Sequenzdatenbanken hinterlegt. Durch das Mitführen dieser beiden Viren und dem anschließenden Vergleich der erhaltenen Sequenz mit der bereits hinterlegten Sequenz konnte zusätzlich die korrekte Durchführung der Sequenzierungsreaktion überprüft werden.

Der Vergleich der erhaltenen Sequenzen wurde mit BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, ALTSCHUL et al., 1990) auf der NCBI website (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA) durchgeführt. Dabei wurden das Programm BLASTN 2.2.22 (ZHANG et al., 2000) und der Algorithmus megablast verwendet. Die Sequenzen wurden untereinander (paarweises Alignment) und mit in den DNA-Sequenzdatenbanken GenBank (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA), EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Cambridge, UK) und DDBJ (Data Bank of Japan, Mishima, Japan) vorhandenen Sequenzen verglichen.

### 3.31 Statistische Analysen

Die statistischen Auswertungen zur Beurteilung der Ergebnisse des ELISA (s. Punkt 4.7) wurden mit Hilfe von mathematisch definierten Formeln (SCHIRA, 2005) vorgenommen:

$$\text{Arithmetischer Mittelwert } \bar{x} := \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n x_j$$

$$\text{Varianz } s_x^2 := \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2$$

$$\text{Standardabweichung } s_x := +\sqrt{s_x^2}$$

$$\text{Variationskoeffizient } VK_x := \frac{s_x}{|\bar{x}|}$$

$$\text{Bestimmtheitsmaß } R^2 := \frac{s_y^2}{s_x^2}$$

$$\text{Kovarianz } c_{xy} := \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})$$

---

Regressionsgerade  $y(x) = a + bx$  mit  $a = \bar{y} - b\bar{x}$  und  $b = \frac{C_{XY}}{S_X^2}$

Zur Auswertung der Daten und zur Erstellung der Grafiken wurde das Programm Microsoft Excel genutzt.

Die statistischen Berechnungen in dieser Arbeit wurden mit dem Programm SPSS Statistics 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) erstellt. Die Varianzhomogenität der Proben wurde mit Hilfe des Levene-Tests überprüft. Da bei den von mir untersuchten Proben jeweils zwei voneinander unabhängige Stichproben vorlagen, wurde der t-Test verwendet. Bei der Durchführung des Tests wurde ein Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % angenommen.

## 4 ERGEBNISSE

Acht Reptilienvirusisolate (882/96, 4152/07, 5187/07, 5810/07, 6172/07, 354/08, CU10/08 und CU60/09) sowie zwei Amphibienranaviren (FV-3 und 1834/04) wurden vergleichend untersucht. Mittels Chloroform- und IUDR-Test (s. Punkt 4.2), der Ranavirus-spezifischen PCR (MAO et al., 1997) und dem Ranavirus-typischen cpE (s. Punkt 4.1) konnte gezeigt werden, dass es sich bei den acht Reptilienisolaten um Vertreter des Genus *Ranavirus* handelt. Es konnten keine hämagglutinierenden Eigenschaften der zehn untersuchten Ranaviren nachgewiesen werden (s. Punkt 4.5). Das Vermehrungsverhalten dieser zehn Isolate wurde in Abhängigkeit von der angebotenen Zellkultur und Temperatur untersucht (s. Punkt 4.4). Mit Hilfe der Restriktionsenzymanalyse (s. Punkt 4.9) und der Sequenzanalyse (s. Punkt 4.10) wurden die verwandtschaftlichen Beziehungen dieser zehn Ranaviren untersucht.

Zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern wurde von mir unter Berücksichtigung der Ergebnisse von JOHNSON et al. (2007) ein ELISA etabliert (s. Punkt 4.7). Mit diesem Test wurden 227 Seren auf das Vorhandensein von Antikörpern untersucht. Bei acht genesenen *Testudo hermanni* konnten Antikörper gegen Ranaviren nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu gelang der Nachweis einer neutralisierenden Aktivität dieser Antikörper in der TH-1-Zellkultur nicht (s. Punkt 4.6).

Es wurden Untersuchungen zur Optimierung der bestehenden PCR-Methode (s. Punkt 4.8) und der Nachweise in TH-1-Zellkultur (s. Punkt 4.3 und 4.14) durchgeführt. In einigen Beständen wurden epidemiologische Untersuchungen zum Verlauf der Krankheit und der Antikörpertiter durchgeführt (s. Punkt 4.11-4.13).

### 4.1 Zytopathischer Effekt

Mit Ranavirus infizierte Zellkulturen (TH-1, VH2, MDBK, BHK und KOP) zeigten die nachfolgend beschriebenen morphologischen Veränderungen (Abbildungen 9-11). Zuerst rundeten sich stellenweise einzelne Zellen ab. Diese lösten sich später von dem Flaschenboden, so dass Löcher im Zellrasen entstanden. Diese



Löcher waren von abgerundeten Zellen umgeben. Die umliegenden Zellen zeigten zu diesem Zeitpunkt noch ein unverändertes Zellbild. Die Löcher vergrößerten sich weiter, bis nur noch dünne Stege bestehend aus abgerundeten Zellen stehen blieben. Auch diese Stege lösten sich ab, so dass nur noch vereinzelt Zellen am Boden der Zellkulturflaschen zu finden waren. Die abgelösten, abgerundeten Zellen waren im Anzuchtmedium zu sehen. Nur ganz vereinzelt kam es zur Lysis der abgelösten Zellen, so dass eine geringe Menge Zelltrümmer ebenfalls im Anzuchtmedium zu erkennen war.

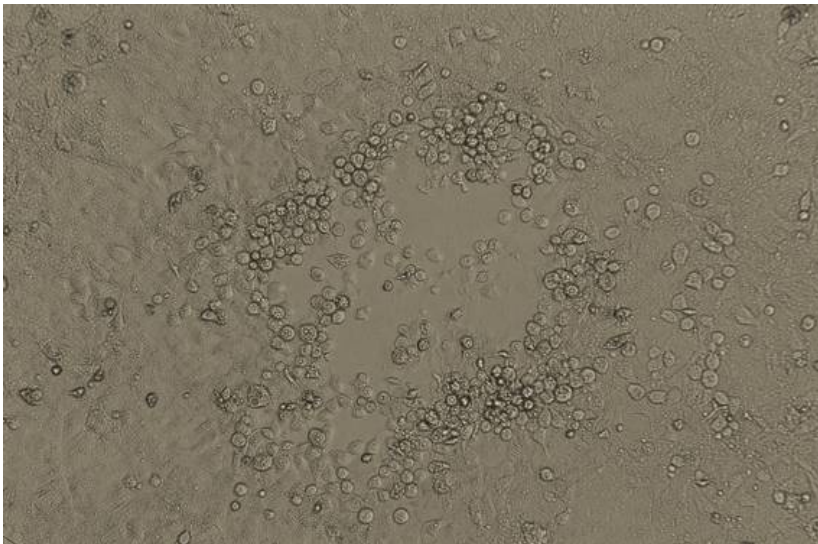
Je nach hinzugegebener Virusmenge spielten sich die beschriebenen Zellveränderungen unterschiedlich schnell ab.



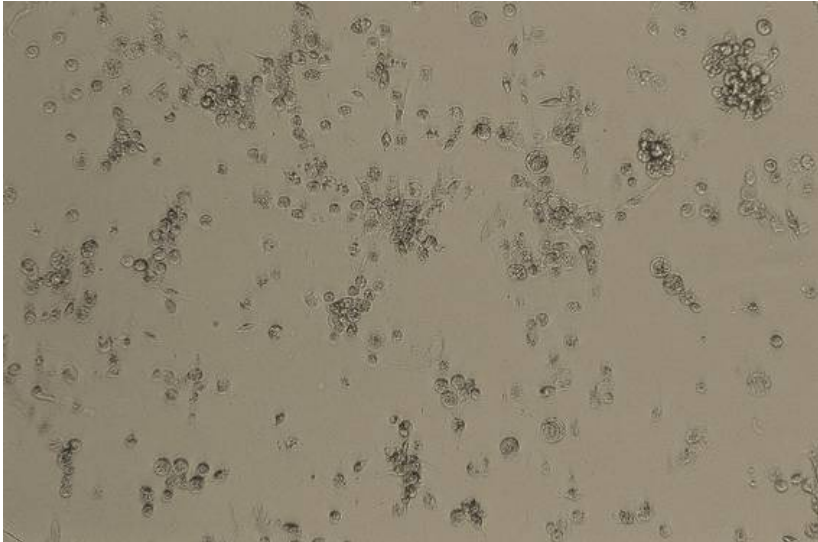
**Abbildung 8:** Unveränderte, konfluente, nicht inokulierte TH-1-Zellkultur (Kontrolle). Sieben Tage nach Subkultivierung der Zellen (Nativpräparat, 100 x)



**Abbildung 9:** Beginnender herdförmiger cpE bestehend aus abgerundeten Zellen in einer konfluenten TH-1-Zellkultur. Vier Tage nach der Inokulation des Ranavirus 5810/07 (Nativpräparat, 100 x)



**Abbildung 10:** Fortgeschrittener herdförmiger cpE bestehend aus abgelösten Zellen im Zentrum und abgerundeten Zellen in der Peripherie des cpE im Zellrasen einer konfluenten TH-1-Zellkultur. Sechs Tage nach der Inokulation des Ranavirus 5810/07 (Nativpräparat, 100 x)



**Abbildung 11:** Fast vollständig zerstörter, nur noch aus abgerundeten Zellen bestehender, vormals konfluenter Zellrasen einer TH-1-Zellkultur. Zwölf Tage nach der Inokulation des Rana-virus 5810/07 (Nativpräparat, 100 x)

#### 4.2 Chloroform- und IUDR-Tests

Acht Reptilienvirusisolate (882/96, 4152/07, 5187/07, 5810/07, 6172/07, 354/08, CU10/08 und CU60/09) sowie zwei Amphibienranaviren (FV-3 und 1834/04) wurden mit Hilfe des Chloroform- und des IUDR-Tests auf das Vorhandensein einer lipidhaltigen Hülle und ihren Nukleinsäuretyp untersucht. Tabelle 10 stellt die Ergebnisse dar.

Nach der Chloroformbehandlung war bei keinem der zehn untersuchten Virusisolate ein cpE feststellbar. Nicht mit Chloroform behandelte Isolate zeigten während des Beobachtungszeitraums von sechs Tagen den erwarteten cpE. In den nicht mit Virus inokulierten Zellkulturen blieb ein dichter Zellrasen erhalten. Chloroform zerstört die Lipidhülle von Viren und vernichtet somit die Infektiosität von behüllten Viren. Somit handelt es sich bei den untersuchten Isolaten um behüllte Viren.

In den virusinfizierten Zellkulturen mit IUDR im Anzuchtmedium zeigte sich ein zytopathischer Effekt. Bei der gleichzeitig durchgeführten Titerbestimmung erbrachten die mit IUDR kultivierten Zellkulturen  $KID_{50}$ -Werte, die deutlich niedriger ausfielen als die der unbehandelten Kontrollen. IUDR wird während der Virusvermehrung anstelle von Thymin in die DNA eingefügt und führt dadurch zu einem Abbruch der DNA-Synthese. Die Kokultivierung mit IUDR führte bei allen Virusisolaten zu einer Reduktion der Infektiositätstiter um 2,0 bis zu 4,2 Zehnerpotenzen. Der Grad der Titerreduktion fiel nicht bei allen Isolaten gleich aus. Es zeigte sich jedoch, dass die Virustiter der Kontrolle und des IUDR-Test signifikant verschieden sind ( $p < 0,001$ ). Da die in diesem Test eingesetzten Isolate eine Reduktion des Virustiters nach Kokultivierung mit IUDR zeigten, handelt es sich um Viren mit einem DNA-haltigen Genom.

**Table 10:** Einfluss der Chloroformbehandlung und der Kokultivierung mit IUDR (50 µg/ml) auf die Infektiositätstiter der zehn Virusisolate im Vergleich zu den Kontrolltitrationen

Virus	Infektiositätstiter in $KID_{50}$ in $\log_{10}$ je ml		
	Kontrolle	Chloroformbehandlung	IUDR im Medium (Differenz zur Kontrolle)
882	8,6	<2,1	4,4 (4,2)
4152	4,9	<2,1	<2,1 (>2,8)
5187	5,1	<2,1	3,1 (2,0)
5810	6,1	<2,1	3,1 (3,0)
6172	4,6	<2,1	2,6 (2,0)
354	4,6	<2,1	<2,1 (>2,5)
CU10	5,1	<2,1	3,1 (2,0)
CU60	5,6	<2,1	3,4 (2,2)
FV-3	7,4	<2,1	5,4 (2,0)
1834	6,6	<2,1	3,1 (3,5)

**4.3 Filtration**

Für die Virusisolierung in Zellkulturen ist eine Filtration der Proben zur Entfernung von regelmäßig im Probenmaterial vorhandenen Bakterien und / oder Pilzen erforderlich. Es wurde geprüft, ob und inwieweit die für die Zellkultur nötige Filtration der Virussuspension die Höhe der Virustiter beeinflusst. Hierzu wurde beispielhaft das Ranavirusisolat 5810/07 mit einer KID<sub>50</sub> vor der Filtration von 10<sup>6,1</sup> je ml eingesetzt. Das Virusisolat 5810/07 war zuvor in TH-1-Zellkultur vermehrt worden und wurde durch Einfrieren und Auftauen aus den Zellen gewonnen. Die Virussuspension, die durch einen Membranfilter mit einer mittleren Porenweite von 0,45 µm filtriert worden war, zeigte eine KID<sub>50</sub> von 10<sup>4,9</sup> je ml. Virushaltiger Zellkulturüberstand, der durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,2 µm filtriert wurde, wies einen Titer von 10<sup>3,9</sup> je ml auf.

**4.4 Virusvermehrung in verschiedenen Zellkulturen bei 28 °C und 37 °C**

Zur Optimierung der Vermehrung der Ranavirusisolate in Abhängigkeit von der verwendeten Zellkultur und der Kultivierungstemperatur wurden die zehn Ranaviren mit folgender KID<sub>50</sub> je ml eingesetzt:

Virus	882	4152	5187	5810	6172	354	CU10	CU60	FV-3	1834
in log <sub>10</sub>	4,4	3,6	4,9	3,9	5,1	4,4	5,1	3,6	4,6	3,9

Die zehn Ranaviren wurden in acht verschiedenen Zelllinien (TH-1, VH2, MDBK, BGM, BHK, KOP, SFT und Na) bei jeweils zwei Inkubationstemperaturen (28 °C und 37 °C) für je zwei Passagen (insgesamt 12 Tage) vermehrt.

Die Säugetierzellen wurden bisher bei 37 °C kultiviert. Sie zeigten bei 28 °C ein verschlechtertes Wachstum. Die Reptilienzellen wurden bisher bei 28 °C gehalten und vermehrten sich bei 37 °C entweder nur wenig oder gar nicht. Die Zelllinien MDBK, BHK und KOP tolerierten die Temperaturreduktion am besten und zeigten innerhalb eines Zeitraums von sechs Tagen ein annähernd normales Wachstum. Die Zelllinien TH-1, SFT und Na wuchsen zwar trotz der Temperaturveränderung weiter, bildeten jedoch keinen kompletten Zellrasen innerhalb einer Beobachtungszeit von sechs Tagen. Bei den VH2- und den BGM-Zellen war nach der Temperaturveränderung kein Zellwachstum mehr zu erkennen, nur die anfänglich eingesäten Zellen waren zu sehen (Tabelle 11).

**Tabelle 11:** Beurteilung der Zellmorphologie ohne Virusinokulation

Temperatur	Morphologie der nativen Zellkulturen							
	Reptilienzellen		Säugetierzellen					
	TH-1	VH2	MDBK	BGM	BHK	KOP	SFT	Na
28 °C	++ / ++	++ / ++	++ / ++	- / -	++ / ++	++ / ++	+ / +	+ / +
37 °C	+ / +	- / -	++ / ++	++ / ++	++ / ++	++ / ++	++ / ++	++ / ++

Legende:

Kultivierung für 6 Tage (1. Passage) / 12 Tage (2. Passage) bei 28 °C bzw. 37 °C

- : kein Zellwachstum
- + : verschlechtertes Zellwachstum
- ++ : normales Zellwachstum

Die oben genannten, bei 37 °C inkubierten Zellkulturen zeigten weniger zytopathische Effekte als die bei 28 °C gehaltenen Zellkulturen (Tabelle 12 und Tabelle 13). Nur bei den Zelllinien BHK, KOP, SFT und Na waren für die Viren 5187/07, 6172/07 und CU10/08, bei BGM zusätzlich, wenn auch etwas schwächer, für die Viren 5810/07 und 354/08, zytopathische Effekte zu sehen. Die zweite Passage in der gleichen Zellkultur verstärkte den cpE nicht. Der cpE stellte sich nur noch in wenig ausgeprägter Form dar oder trat gar nicht mehr auf.

**Tabelle 12:** Semiquantitative Beurteilung der Morphologie der mit Ranavirus inokulierten Zellkulturen nach Kultivierung für 6 bzw. 12 Tage bei 37 °C

Virus	Morphologie der inokulierten Zellkulturen bei 37 °C							
	Reptilienzellen		Säugetierzellen					
	TH-1	VH2	MDBK	BGM	BHK	KOP	SFT	Na
882	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
4152	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
5187	-/-	-/-	-/-	++/(+)	++/-	+/+	++/-	+/+
5810	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
6172	-/-	-/-	-/-	++/++	++/-	+/+	++/-	+/+
354	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-	-/-	-/-	-/-
CU10	-/-	-/-	-/-	++/++	++/-	++/++	++/(+)	+/+
CU60	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
FV-3	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
1834	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

Legende:

Kultivierung für 6 Tage (1. Passage) / 12 Tage (2. Passage) bei 37 °C

- : keine Veränderung
- (+) : geringgradiger cpE
- + : mittelgradiger cpE
- ++ : hochgradiger cpE

Bei den bei 28 °C inkubierten Zellkulturen waren, übereinstimmend mit ihrem verminderten Wachstum, bei den Zelllinien BGM, SFT und Na keine Veränderungen zu erkennen. Alle anderen Zelllinien (TH-1, VH2, MDBK, BHK und KOP) zeigten zytopathische Effekte, die sich in der zweiten Passage verstärkten.

**Tabelle 13:** Semiquantitative Beurteilung der Morphologie der mit Ranavirus inkulierten Zellkulturen nach Kultivierung für 6 bzw. 12 Tage bei 28 °C

Virus	Morphologie der inkulierten Zellkulturen bei 28 °C							
	Reptilienzellen		Säugetierzellen					
	TH-1	VH2	MDBK	BGM	BHK	KOP	SFT	Na
882	(+) / ++	(+) / +	(+) / +	- / -	(+) / ++	(+) / ++	- / -	- / -
4152	+ / ++	(+) / ++	- / +	- / -	(+) / ++	(+) / ++	- / -	- / -
5187	++ / ++	+ / ++	(+) / +	- / -	(+) / ++	+ / ++	- / -	- / -
5810	+ / ++	(+) / ++	- / +	- / -	(+) / ++	(+) / ++	- / -	- / -
6172	++ / ++	+ / ++	- / ++	- / -	(+) / ++	+ / ++	- / -	- / -
354	+ / ++	(+) / ++	- / +	- / -	(+) / ++	+ / ++	- / -	- / -
CU10	++ / ++	+ / ++	(+) / ++	- / -	(+) / ++	+ / ++	- / -	- / -
CU60	(+) / ++	(+) / ++	+ / ++	- / -	(+) / ++	+ / ++	- / -	- / -
FV-3	+ / ++	+ / ++	- / +	- / -	(+) / ++	(+) / +	- / -	- / -
1834	+ / ++	(+) / ++	- / (+)	- / -	(+) / ++	(+) / +	- / -	- / -

Legende:

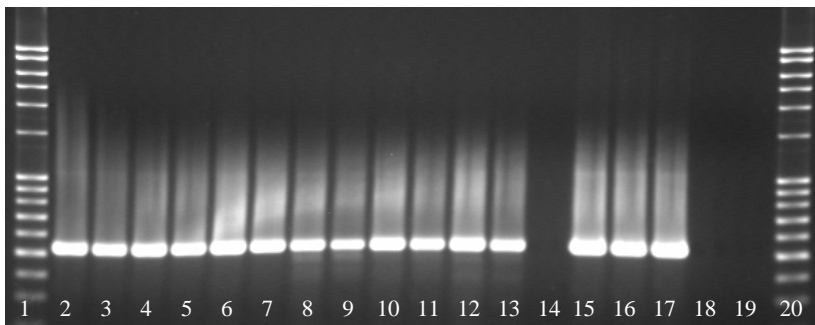
Kultivierung für 6 Tage (1. Passage) / 12 Tage (2. Passage) bei 28 °C

- : keine Veränderung
- (+) : geringgradiger cpE
- + : mittelgradiger cpE
- ++ : hochgradiger cpE

Anschliessend an die zwei Passagen in den Zellkulturen bei 28 bzw. 37 °C wurden die Virustiter anhand von Titrationsen in TH-1-Zellkultur bei 28 °C bestimmt. Die Virussuspensionen aus den bei 37 °C inkubierten Zellkulturen riefen bei der Bestimmung der Virustiter keinen cpE hervor ( $KID_{50} < 10^{2,1}$  je ml). Um auszuschließen, dass die Viren sich zwar vermehrt haben, aber auf TH-1-Zellen



bei 28 °C keinen cpE mehr verursachen, wurden beispielhaft die bei 37 °C in den KOP-Zellen gezüchteten Viren 5810/07, 6172/07 und 5187/07 mittels PCR untersucht. Da die anfänglich auf die Zellen gegebene Virusmenge nicht entfernt wurde, wurde als Vergleich Virus mit der genutzten Anfangs-KID<sub>50</sub>, entsprechend der zwei Passagen um 10<sup>-2</sup> verdünnt, mitgeführt. In der PCR stellten sich für alle Viren Banden im Bereich 500 bp dar, die ungefähr dieselbe Stärke hatten (Abbildung 12). Dieses zeigte, dass sich die Viren bei 37 °C nicht vermehrt hatten.



**Abbildung 12:** Mit Ethidiumbromid dargestellte Banden der bei 37 °C für 12 Tage in KOP-Zellen gezüchteten Ranaviren

Spur 1,20: Marker, Spur 2-7: Original-Virus 0,01 Anfangs-KID<sub>50</sub>, Spur 2: 5810/07 konz., Spur 3: 5810/07 10<sup>-1</sup>, Spur 4: 6172/07 konz., Spur 5: 6172/07 10<sup>-1</sup>, Spur 6: 5187/07 konz., Spur 7: 5187/07 10<sup>-1</sup>, Spur 8-13: Virus nach der 2. Passage in KOP-Zellen, Spur 8: 5810/07 konz., Spur 9: 5810/07 10<sup>-1</sup>, Spur 10: 6172/07 konz., Spur 11: 6172/07 10<sup>-1</sup>, Spur 12: 5187/07 konz., Spur 13: 5187/07 10<sup>-1</sup>, Spur 14,18, 19: Negativkontrolle, Spur 15, 16, 17: Positivkontrolle

Die aus den bei 28 °C inkubierten Zellkulturen bestimmten Virustiter entsprachen in etwa den beobachteten Zellveränderungen (Tabelle 14 und Tabelle 15). Die in den Zelllinien BGM, SFT und Na gezüchteten Viren wiesen im Durchschnitt die niedrigsten KID<sub>50</sub> auf, wie sich schon vorher anhand der nicht vorhandenen Zellveränderungen vermuten ließ. In den Zelllinien TH-1, VH2 und BHK haben sich die Viren am stärksten vermehrt. Die höchsten Titer ließen sich in diesen drei Zelllinien bei den Viren FV-3 und 1834/04 (beide ursprünglich von Amphibien stammend) erkennen.

**Tabelle 14:** Infektiositätstiter 6 Tage nach der 2. Passage der Ranavirusisolate bei 28 °C

Virus	Infektiositätstiter in KID <sub>50</sub> in log <sub>10</sub> je ml							
	Reptilienzellen		Säugetierzellen					
	TH-1	VH2	MDBK	BGM	BHK	KOP	SFT	Na
882	>11,1	8,4	5,4	3,6	8,1	6,1	<2,1	<2,1
4152	>11,1	5,9	5,6	3,4	10,6	5,1	<2,1	<2,1
5187	>11,1	7,6	5,9	4,6	7,4	4,4	2,6	3,1
5810	10,4	10,1	5,4	3,4	8,4	4,6	2,9	<2,1
6172	>11,1	7,1	5,9	5,1	9,4	6,1	2,4	3,4
354	>11,1	6,1	4,9	3,4	7,1	5,6	<2,1	2,6
CU10	10,9	6,6	7,1	4,4	7,9	5,4	3,4	3,4
CU60	10,6	6,4	5,1	5,4	6,9	4,1	2,6	<2,1
FV-3	10,9	>11,1	4,6	3,9	11,1	3,9	<2,1	3,1
1834	>11,1	>11,1	3,9	<2,1	>11,1	4,1	2,4	3,6

**Tabelle 15:** Infektiositätstiter 13 Tage nach der 2. Passage der Ranavirusisolate bei 28 °C

Virus	Infektiositätstiter in KID <sub>50</sub> in log <sub>10</sub> je ml							
	Reptilienzellen		Säugetierzellen					
	TH-1	VH2	MDBK	BGM	BHK	KOP	SFT	Na
882	>11,1	10,1	5,4	3,9	8,9	6,4	<2,1	<2,1
4152	>11,1	7,9	6,4	3,4	10,6	5,4	2,4	<2,1
5187	>11,1	8,6	6,9	5,6	7,9	4,4	2,9	3,6
5810	10,9	10,4	5,4	3,6	9,9	5,1	2,9	<2,1
6172	>11,1	9,1	6,6	5,1	10,4	6,1	2,9	3,9
354	>11,1	7,6	5,4	3,6	8,6	6,1	2,9	2,6
CU10	11,1	7,9	9,1	4,6	9,1	5,4	3,9	3,9
CU60	10,9	7,6	5,6	5,9	8,1	4,4	2,9	<2,1
FV-3	11,1	>11,1	4,6	3,9	>11,1	4,1	<2,1	3,1
1834	>11,1	>11,1	4,1	<2,1	>11,1	4,1	2,4	3,9

#### 4.5 Hämagglutinationstest

Es wurde überprüft, ob die verwendeten Ranaviren hämagglutinierende Eigenschaften aufweisen. Die zehn getesteten Virusisolate (FV-3, 882/96, 1834/04, 4152/07, 5187/07, 5810/07, 6172/07, 354/08, CU10/08 und CU60/09) zeigten weder mit Hühner- noch mit Humanerythrozyten der Blutgruppe 0 eine Agglutinationsreaktion.

#### 4.6 Neutralisationstest

Zu Beginn der Untersuchung stand kein Testsystem zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern zur Verfügung. Es war somit nicht festzustellen, ob die vorliegenden Seren Antikörper gegen Ranaviren enthalten. Daher wurden 49 Seren gegen sechs verschiedene Testviren mit Neutralisationstests in vier verschiedenen Varianten untersucht:

A: Virussuspension-Serum-Inkubation für 24 h bei 28 °C,

B: Virussuspension-Serum-Inkubation für 24 h bei 37 °C,

C: Virussuspension-Serum-Inkubation für 1 h bei 28 °C,

D: Virussuspension-Serum-Inkubation für 2 h bei 28 °C mit anschließender Zugabe eines sekundären Antikörpers (Maus-anti-Schildkröten-Antikörper HL1546) und nachfolgender Inkubation bei 28 °C für 1 h

In allen vier Varianten der Neutralisationstests (Tabelle 16) rief die Virusgebrauchsverdünnung in der Viruskontrolle einen deutlichen cpE hervor und wies einen Titer von  $10^{1,5}$  bis  $10^{2,5}$  auf. Alle getesteten Seren konnten in keiner Serumverdünnungsstufe die Ausbildung eines zytopathischen Effekts verhindern.

**Tabelle 16:** Eingesetzte Seren, verwendete Virusisolate sowie methodische Variationen der Virus-Serum-Inkubation der durchgeführten Neutralisationstests

Getestete Seren	Verwendete Ranavirusisolate					
	5810	5187	6172	4152	882	CU60
F2.1	A					
B1.1	A					
B1.2	A					
B1.3	A					
B1.4	A					
B1.5	A					
B1.6	A					
B1.7	A					
B1.8	A					
B1.9	A					
B1.10	A					
B1.11	A					
B1.12	A					
B1.13	A&D					
B1.14	A					
B1.15	A					
B1.16	A	B		B		
B1.17	A					
B1.18	A					
F3.1	A					
F3.2	A					
F3.3	A					
F3.4	A					
F3.5	A					
F3.6	A	B		B		
F3.7	A					
M1.1		B	A	A&B		
M1.2	D		A	A		
E1.1			A			
E1.2			A			
E1.3			A			
E1.4			A			
E1.5			A			
E1.6			A			
E1.7			A			
E1.8			A			
E1.9			A			
E1.10			A			
E1.11			A			
E1.12			A			
E1.13			A			
E1.14			A			
E2.1	A&C			A	C	
E2.2	A&C	B		A&B	C	
E2.3	A&C			A	C	
M2.1					A,B,C,D	A,B,C,D
G2	C					
G3	C					
K2	C					

Legende:

A: Virussuspension-Serum-Inkubation 24 h bei 28°C

B: Virussuspension-Serum-Inkubation 24 h bei 37°C

C: Virussuspension-Serum-Inkubation 1 h bei 28°C

D: Virussuspension-Serum-Inkubation 2 h bei 28°C, Zugabe sekundärer Antikörper mit nachfolgender Inkubation 1 h bei 28°C

Nachdem im Laufe dieser Arbeit von mir ein ELISA zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern entwickelt worden war (s. Punkt 4.7), wurde das Serum mit der stärksten positiven Reaktion im ELISA (M2.1) ausgewählt, um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren. Das Serum wurde mit allen vier Virussuspension-Serum-Inkubations-Methoden (s. o.) gegen die beiden im ELISA eingesetzten Testviren 882/96 und CU60/09 getestet. Die Virusgebrauchsverdünnung rief in der Viruskontrolle einen deutlichen cpE hervor und wies einen Titer von  $10^{1,5}$  bis  $10^{2,5}$  auf. Die Ausbildung eines zytopathischen Effekts durch die beiden Testviren konnte durch das Serum jedoch in keiner Verdünnungsstufe verhindert werden.

Für den modifizierten Neutralisationstest (Virus-Serum-Inkubation für 1 h auf Eis bzw. bei 28 °C und anschließende Virustiterbestimmung, s. Punkt 3.25 bzw. MANIERO et al., 2006) wurde ebenfalls ein im ELISA stark positives Serum (G3) ausgewählt. Als Testvirus wurde das aus demselben Bestand stammende Virus CU60/09 gewählt. Im Gegensatz zu MANIERO et al. (2006) konnten nach der Virus-Serum-Inkubation keine gelatinösen Immunopräzipitate beobachtet werden. In der Virustitration zeigte die Virus-Serum-Suspension im Vergleich zur Kontrolle eine gleichhohe oder sogar etwas erhöhte  $KID_{50}$ . Somit konnte keine neutralisierende Aktivität von Ranavirus-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

## 4.7 ELISA

### 4.7.1 Bestimmung der Konzentration der im ELISA eingesetzten Virusmenge

Zu Beginn dieser Untersuchungen wurde Virus 882/96 im ELISA eingesetzt. Nach dem Aufreinigen und Aufkonzentrieren der Virussuspension wurden die  $KID_{50}$  und der Proteingehalt mit der Methode nach BRADFORD (1976) bestimmt. Anhand der Bestimmung der  $KID_{50}$  ließ sich gut das Vorhandensein von Viren in der Virussuspension bzw. das völlige Fehlen von Viren in der Kontroll suspension (ebenso wie die Virussuspension aufbereitet aus nicht infizierten TH-1-Zellen) nachweisen. Zur Bestimmung der nötigen Verdünnungsstufe der Virussuspension zeigte sich die  $KID_{50}$  jedoch wenig geeignet, da zwischen verschiedenen Viren Unterschiede in der Ausprägung des zytopathischen Effekts vorhanden sein können. Die Bestimmung des Proteingehalts mit der Methode nach BRADFORD (1976) stellte sich als nicht gut durchführbar dar, da nur geringe Extinktionsunterschiede zwischen Virus- und Kontroll suspension gemessen wurden. Daraufhin wurde der Proteingehalt durch eine Messung der Extinktion bei 280 nm ohne Zugabe von Reagenzien (Farbindikatoren) bestimmt. Für die Virussuspension ergab sich ein Proteingehalt von 234  $\mu\text{g/ml}$ . Die Kontroll suspension ergab einen Proteingehalt von 54  $\mu\text{g/ml}$ .

### 4.7.2 Einstellung der ELISA-Komponenten

Es wurden verschiedene Verdünnungen der Virussuspension, des sekundären Antikörpers und der Alkalischen Phosphatase im ELISA ausgetestet. Dabei zeigten sich nach Einsatz der weniger stark verdünnten Reagenzien stets höhere Extinktionen der positiven Seren. Es fiel auf, dass bis zu einer bestimmten Verdünnung nur ein geringer Extinktionsverlust auftrat und die anschließende Verdünnung zu einem starken Extinktionsverlust führte. Um die Balance zwischen einem sparsamen Einsatz der zum Teil begrenzt vorhandenen Reagenzien und einer deutlichen Extinktion zu finden, wurde jeweils die Verdünnungsstufe gewählt, die vor dem starken Extinktionsverlust lag. Die ausgewählten Verdünnungsstufen sind in Tabelle 17 durch Fettdruck hervorgehoben.

**Tabelle 17:** Ausgewählte (durch Fettdruck hervorgehobene) Verdünnungsstufe der im ELISA eingesetzten Komponenten

ELISA-Komponenten	Verdünnungen
Virus suspension 882/69	1:10, 1:15, <b>1:20</b> , 1:30
sekundärer, biotinilierter Antikörper HL1546	1:1.000, <b>1:10.000</b>
Alkalische Phosphatase (700-1.400 DEA units/mg)	1:250, <b>1:500</b> , 1:5.000

Im Vergleich eines ELISA, der mit Puffern auf PBS-Basis durchgeführt wurde, zu einem ELISA, der mit Puffern auf TBS-Basis durchgeführt wurde, zeigte der ELISA mit PBS-Puffer deutlich höhere Extinktionen der positiven Seren, so dass in diesem Fall keine Hemmung der Alkalischen Phosphatase durch das im Puffer enthaltene Phosphat zu bemerken war. Bei Vermeidung des Einsatzes von Tween vor und während dem Blocken der ELISA-Platten wurden geringgradig erhöhte Extinktionswerte festgestellt. Anhand dieser Ergebnisse wurden Puffer auf PBS-Basis für den ELISA verwendet und der Einsatz von Tween vor dem Blocken der Platten vermieden. Dieses führte zudem zu einer Arbeitserleichterung, da ein kompletter Waschschrift entfällt.

#### 4.7.3 Einstellung der Inkubationstemperatur

Bei Austestung der verschiedenen Inkubationstemperaturen zeigten sich nach einer Inkubation bei 21 °C die niedrigsten Extinktionswerte. Die höchsten Extinktionswerte waren nach einer Inkubation bei 37 °C zu verzeichnen. Dabei waren nicht nur die Extinktionswerte der positiven Seren, sondern auch der negativen Seren und der Zellkontrollen erhöht. Dieses führte zu keinem diagnostischen Vorteil. Gegebenenfalls können durch die erhöhten Hintergrundsignale sogar schwach positive Seren übersehen werden. Die Inkubation bei 28 °C, bei 30 °C und bei Raumtemperatur zeigte keine nennenswerten Differenzen in den gemessenen Extinktionen. Aus Gründen der Vereinfachung wurde daher die Inkubation bei Raumtemperatur gewählt.

#### 4.7.4 Überprüfung der Qualitätsparameter

Um die Qualität eines neuen serologischen Testsystems festzustellen, gibt es verschiedene Testkriterien. Dazu gehören die Intra-Assay-Präzision, die Inter-Assay-Präzision und die Prüfung der Verdünnungsechtheit.

##### 4.7.4.1 Intra-Assay-Präzision

Um die Varianz der Ergebnisse innerhalb einer Testplatte zu bestimmen, wurden zwei verschiedene Seren, ein Positivserum (K3) und ein Negativserum (1108), achtmal auf derselben Testplatte eingesetzt. Der errechnete Variationskoeffizient sollte unter 20 % liegen, um eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (NOELLE et al., 1992). Die errechneten Variationskoeffizienten lagen deutlich unter 20 % (Tabelle 18).

**Tabelle 18:** Berechnung der Intra-Assay-Präzision

Serum (Verdünnung)	Mittelwert ( $\Delta OD_{405}$ )	Standardabweichung ( $\Delta OD_{405}$ )	Variationskoeffizient (%)
K3 (1:10)	2,58	0,18	7,0
K3 (1:100)	0,78	0,06	7,4
1108 (1:10)	0,12	0,01	5,6
1108 (1:100)	0,13	0,01	6,6



#### 4.7.4.2 Inter-Assay-Präzision

Um die Varianz der Ergebnisse zwischen mehrmaligen, zeitlich aufeinander folgenden Testansätzen zu bestimmen, wurden dieselben Seren in mehreren Platten eingesetzt. Es wurden ein Positivserum (G2) sowie drei Negativseren (1109, 1110 und 1115) auf acht Testplatten derselben Charge getestet. Der Variationskoeffizient sollte wie bei der Intra-Assay-Präzision unter 20 % liegen, um reproduzierbare Ergebnisse zu sichern (NICOLOFF und SPENCER, 1990). Diese Anforderung wurde auch in der Inter-Assay-Präzision gut erfüllt (Tabelle 19).

**Tabelle 19:** Berechnung der Inter-Assay-Präzision

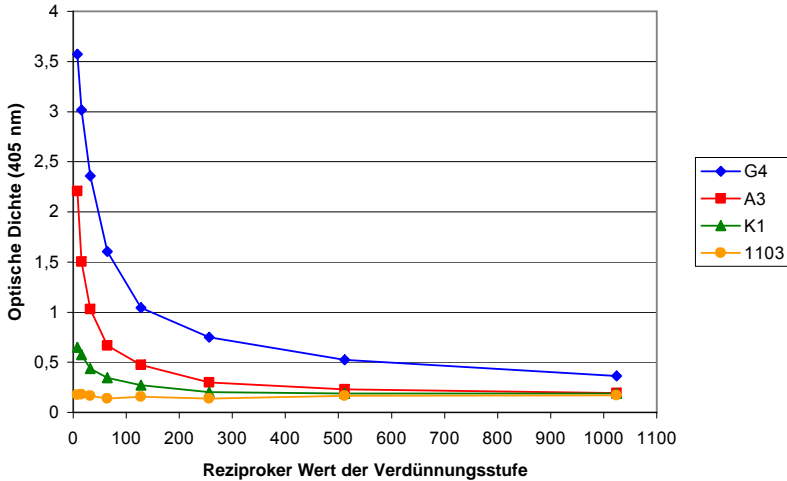
Serum (Verdünnung)	Mittelwert ( $\Delta OD_{405}$ )	Standardabweichung ( $\Delta OD_{405}$ )	Variationskoeffizient (%)
G2 (1:10)	2,93	0,27	9,3
G2 (1:100)	1,05	0,11	10,8
1109 (1:10)	0,10	0,01	5,0
1109 (1:100)	0,10	0,01	6,1
1110 (1:10)	0,10	0,01	5,5
1110 (1:100)	0,10	<0,01	4,3
1115 (1:10)	0,12	0,01	8,1
1115 (1:100)	0,11	0,01	5,6

#### 4.7.4.3 Prüfung der Verdünnungsechtheit

Um die Verdünnungsechtheit zu überprüfen, wurden vier verschiedene Seren in acht Verdünnungsstufen eingesetzt. Es wurden drei positive Seren (G4, A3 und K1) mit unterschiedlich hohen Antikörpergehalten und ein Negativserum (1103) verwendet.

Die Seren wurden in Zweierpotenzen verdünnt (1:8 bis 1:1024). Die optische Dichte der entsprechenden Verdünnungsstufen wurde graphisch dargestellt (Abbildung 13). Wie in dieser Abbildung ersichtlich wird, lassen sich im unteren

Teil der Kurven die spezifischen Signale schlecht von dem sogenannten „Hintergrundrauschen“, verursacht durch unspezifische Bindungen, unterscheiden.

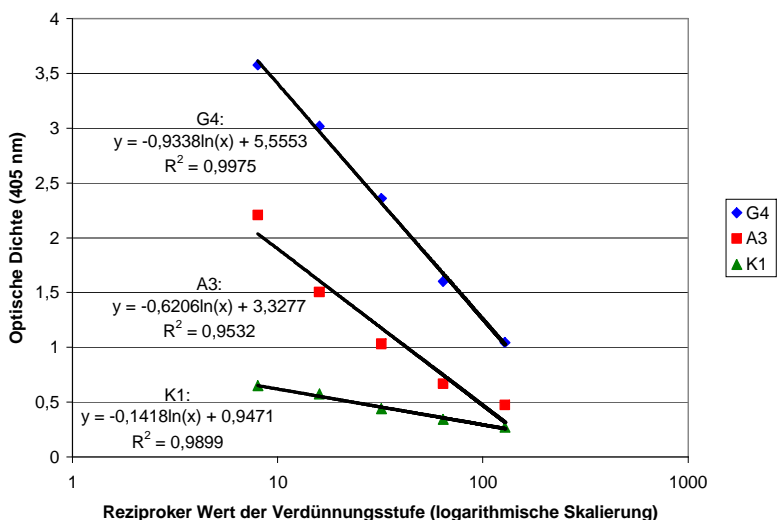


**Abbildung 13:** Graphische Darstellung der optischen Dichte in Abhängigkeit von den Serumverdünnungen in Zweierpotenzen

Bis zum Bereich der Verdünnung 1:128 ist eine gute Differenzierung der positiven Seren (G4, A3 und K1) vom negativen Serum (1103) möglich. In diesen Bereich fallen die beiden im Test genutzten Verdünnungsstufen 1:10 und 1:100. Die optische Dichte der Verdünnungsstufen 1:8 bis 1:128 wurden gegen den Logarithmus der jeweiligen Verdünnungsstufe in einem Graphen aufgetragen und eine Trendlinie hinzugefügt (Abbildung 14). Die Trendlinie der Werte von Probe G4 weist die Formel  $y = -0,9338 \ln(x) + 5,5553$  auf. Die Werte der Probe A3 ergeben eine Trendlinie der Formel  $y = -0,6206 \ln(x) + 3,3277$ . Der Trendlinie der Werte der Probe K1 liegt die Formel  $y = -0,1418 \ln(x) + 0,9471$  zugrunde.

Das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  wurde berechnet. Das Bestimmtheitsmaß kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen. Nimmt das Bestimmtheitsmaß den Wert 1 an, gibt es einen perfekten linearen Zusammenhang zwischen den untersuchten

Werten. Das heißt alle Werte liegen genau auf der errechneten Ausgleichsgeraden (Trendlinie). Ergibt sich hingegen für das Bestimmtheitsmaß der Wert 0, so ist kein linearer Zusammenhang zwischen den untersuchten Werten vorhanden. Eine optimale Verdünnungsechtheit der Proben ist somit gegeben, wenn das Bestimmtheitsmaß den Wert 1 ergibt. Das Bestimmtheitsmaß ergibt für G4 den Wert 1,00, für A3 den Wert 0,95 und für K1 den Wert 0,99 und zeigt somit eine sehr gute Verdünnungsechtheit an.



**Abbildung 14:** Graphische Darstellung der Verdünnungsstufen 1:8 bis 1:128 in logarithmischer Skalierung mit errechneten Ausgleichsgeraden sowie Angabe des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$

#### 4.7.5 Kreuzreaktion mit Herpesvirusantikörpern

Zum Ausschluss von Kreuzreaktionen mit Herpesvirusantikörpern wurden sieben Seren mit nachgewiesenen Herpesvirusantikörpern im Ranavirus-ELISA eingesetzt. In jeweils drei Seren waren Antikörper gegen Herpesvirusantigen 770/95 bzw. 1432/94 nachgewiesen worden. In einem Serum waren Antikörper gegen beide Antigene nachgewiesen worden. Vier der Seren stammten von

*Testudo graeca*. Die übrigen drei Seren stammten von *Testudo hermanni*. Alle sieben Seren ergaben im Ranavirus-ELISA Werte im negativen Bereich (Tabelle 20), so dass Kreuzreaktionen mit Herpesvirusantikörpern ausgeschlossen werden können.

**Tabelle 20:** ELISA-Werte von Seren mit Antikörpern gegen Schildkröten-Herpesvirus zum Abschluss der Kreuzreaktivität

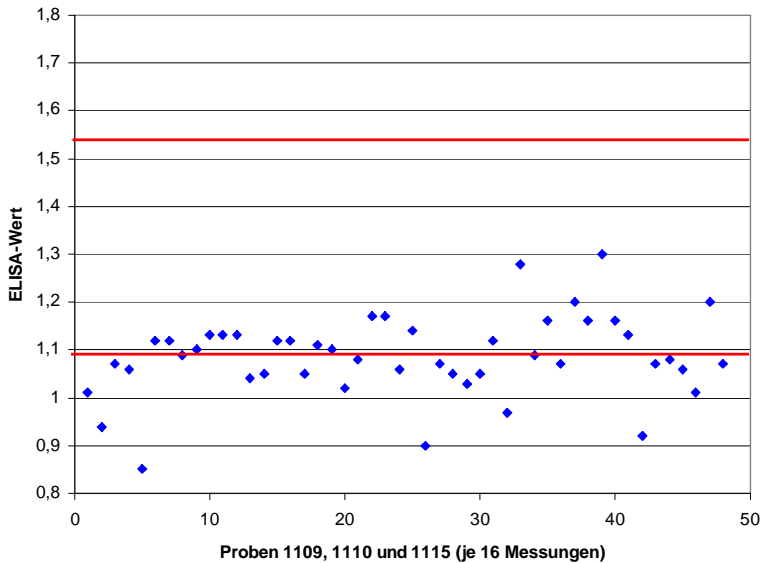
Serum	Antikörpertiter gegen Schildkröten-Herpesvirus		ELISA-Wert der Serumverdünnung	
	770/95	1432/94	1:10	1:100
2136	1:6	1:8	1,09	1,12
2365	1:16	1:4	1,12	1,25
2367	0	1:16	1,07	1,26
2504	1:16	1:6	1,11	0,99
2505	1:10	0	1,09	1,15
2507	1:16	1:10	1,01	0,97
2614	0	1:128	1,08	1,04

#### 4.7.6 Festlegung des Cut-off-Wertes

In einem ELISA können unspezifische Bindungen zu erhöhten Extinktionen, dem sogenannten Hintergrundrauschen, führen. Um dieses Hintergrundrauschen von positiven Proben abzugrenzen, muss eine untere Nachweisgrenze (Cut-off-Wert) festgelegt werden.

Die ELISA-Werte der drei im Inter-Assay-Präzisionsversuch genutzten negativen Seren (1109, 1110 und 1115) wurden dazu verwendet. Wie unter Punkt 3.26 für die Auswertung der im ELISA eingesetzten Seren beschrieben, wurde aus den OD-Werten der zwei Viruswells der arithmetische Mittelwert gebildet und durch den OD-Wert des Kontrollwells geteilt. Von den so erhaltenen 48 ELISA-Werten wurde der arithmetische Mittelwert zuzüglich der fünffachen Standardabweichung als Cut-off-Wert gemäß den Empfehlungen von CUTLER und WRIGHT, 1989 sowie WEBER et al., 1997 festgelegt. Bei einem Mittelwert

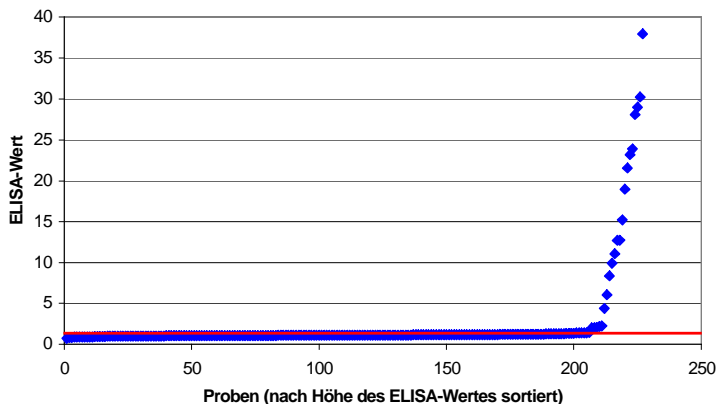
der ELISA-Werte von 1,09 und einer Standardabweichung von 0,09 ergab sich ein Cut-off-Wert von 1,54 (Abbildung 15).



**Abbildung 15:** Graphische Darstellung der 48 ELISA-Werte der Proben 1109, 1110 und 1115 (blaue Punkte), des Mittelwertes (untere rote Gerade) sowie des Cut-off-Wertes (obere rote Gerade)

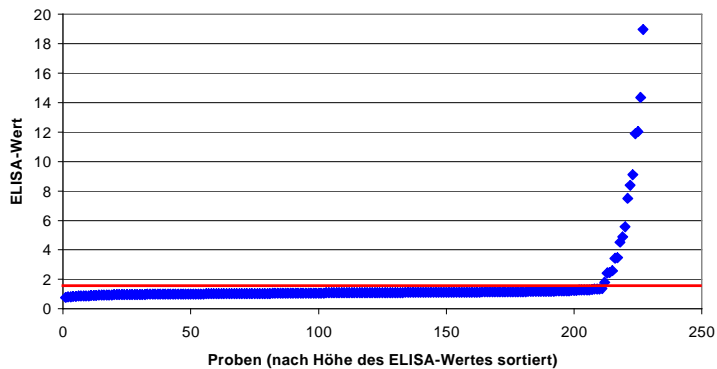
#### 4.7.7 Auswertung der mittels ELISA untersuchten Seren

Insgesamt wurden 227 Seren von unverdächtigen, verdächtigen und erkrankten Schildkröten untersucht. Wurden die Seren in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt, ergaben 21 Seren ELISA-Werte, die oberhalb des Cut-off-Wertes lagen (Abbildung 16).

**Serumverdünnung 1:10**

**Abbildung 16:** Graphische Darstellung der ELISA-Werte aller 227 untersuchten Seren in der Verdünnung 1:10 (blaue Punkte) sowie des Cut-off-Wertes (rote Gerade)

Wurden dieselben Seren in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt, ergaben nur 16 Seren ELISA-Werte oberhalb des Cut off (Abbildung 17).

**Serumverdünnung 1:100**

**Abbildung 17:** Graphische Darstellung der ELISA-Werte aller 227 untersuchten Seren in der Verdünnung 1:100 (blaue Punkte) sowie des Cut-off-Wertes (rote Gerade)

Aus diesem Grund wurde ein fraglicher Bereich definiert. Seren, die in der 1:10 Verdünnung ELISA-Werte oberhalb des Cut-off-Wertes und in der 1:100 Verdünnung ELISA-Werte unterhalb des Cut-off-Wertes aufwiesen, wurden als fraglich bezeichnet. Die fünf Seren, die in den fraglichen Bereich fielen, zeigten auch in der 1:10 Verdünnung relativ niedrige ELISA-Werte (Tabelle 21).

**Tabelle 21:** ELISA-Werte der fraglichen Seren

Serum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
	1:10	1:100
M1.2	4,38	1,35
E3.2	2,00	1,26
H2.7	1,99	1,09
E4.2	2,16	1,06
A1	2,05	1,14

Diese fünf Seren stammten von vier verschiedenen Schildkröten aus drei verschiedenen Beständen. Serum E3.2 und E4.2 wurden von derselben Schildkröte gewonnen. Somit stammten die Seren mit fraglichen Ergebnissen von zwei *Testudo hermanni* (M1.2 und A1) und zwei *Testudo graeca* (E3.2 bzw. E4.2 und H2.7). Bei der nächsten Untersuchung ergaben die Seren der beiden *Testudo hermanni* ELISA-Werte im positiven Bereich (M2.2 und A2, s.u.). Beide *Testudo hermanni* hatten Symptome einer Ranavirusinfektion gezeigt und die Erkrankung überlebt. Von *Testudo graeca* H2.7 stand nur ein Serum zur Verfügung. Von der zweiten *Testudo graeca* standen zwei Seren zur Verfügung, deren Ergebnisse beide in den fraglichen Bereich fielen. Die beiden *Testudo graeca* lebten zwar in Beständen, in denen Erkrankungen durch Ranaviren auftraten, jedoch in Gehegen, in denen alle Schildkröten bisher keinerlei Krankheitssymptome zeigten.

Insgesamt 16 Seren ergaben ELISA-Werte, die in beiden Verdünnungen oberhalb des Cut-off-Wertes lagen (Tabelle 22). Diese 16 Seren stammten von insgesamt acht Schildkröten. Alle acht Schildkröten gehörten zur Spezies *Testudo hermanni*. Alle acht *Testudo hermanni* hatten Symptome einer Ranavirusinfektion gezeigt und die Erkrankung überlebt.

**Tabelle 22:** ELISA-Werte der positiven Seren

Serum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
	1:10	1:100
M1.1	9,92	2,48
E2.1	2,26	1,80
E3.39	23,20	9,11
H2.18	8,35	2,58
H2.19	30,23	11,90
M2.1	37,94	18,97
M2.2	12,71	3,43
G1	12,69	4,88
G2	23,89	8,39
K1	6,06	2,42
G3	28,10	12,04
A2	11,07	3,48
K2	18,97	5,57
G4	29,00	14,35
A3	15,21	4,52
K3	21,55	7,49

Alle Seren, deren ELISA-Werte in den fraglichen oder positiven Bereich fielen, waren Seren aus den Beständen M, E und H und somit aus Beständen, in denen nachweislich Erkrankungen durch Ranaviren aufgetreten waren.

Es konnten nur bei Schildkröten, bei denen eine Erkrankung nach einer natürlichen Infektion mit Ranaviren beobachtet wurde, Antikörper nachgewiesen wer-



den. Die Antikörper ließen sich nicht bei erst vor kurzem erkrankten Schildkröten nachweisen. Bei allen Schildkröten, die eine Erkrankung durch Ranaviren überlebt hatten, konnten Antikörper nachgewiesen werden.

Die Titerverläufe der Schildkröten mit nachgewiesenen Ranavirus-spezifischen Antikörpern sowie die bei den entsprechenden Schildkröten durchgeführten Virusnachweise wurden unter Punkt 4.13 detailliert dargestellt.

#### **4.7.8 Antigenetische Divergenz**

Um zu prüfen, ob antigenetische Divergenzen zwischen Ranaviren aus verschiedenen Beständen vorliegen, wurde ein zweites Virus im ELISA eingesetzt. Dazu wurde das erst vor kurzem isolierte Virus CU60/09 ausgewählt, welches von einer Schildkröte aus Bestand E isoliert worden war. Dieses Virus wurde ebenso wie Virus 882/96 aufgereinigt und aufkonzentriert. Nach Bestimmung des Proteingehalts mittels Extinktionsmessung bei 280 nm wurde die nötige Verdünnung berechnet, so dass der Virusgehalt der Suspension mit Isolat CU60/09 dem der Suspension mit Isolat 882/96 entsprach.

Alle 121 Seren aus Beständen mit nachgewiesenen Ranavirusinfektionen sowie 39 der Seren aus unverdächtigen Beständen wurden auf Antikörper gegen Virus CU60/09 untersucht. Auf Grund der geringen Serumvorräte wurde dabei das Serum nur in einer Verdünnung von  $10^{-2}$  eingesetzt. Die Extinktionswerte des ELISA mit Virus CU60/09 entsprachen denen mit Virus 882/96 und werden daher nicht gesondert dargestellt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die beiden untersuchten Viren, trotz ihrer in Größe und Anzahl unterscheidbaren Fragmente in der Restriktionsenzymanalyse (s. Punkt 4.9), keine im ELISA nachweisbare antigenetische Divergenz aufweisen.

#### 4.8 PCR-Optimierung

In dem Vorversuch zur Feststellung der Sensitivitätsgrenze zeigte sich als letzte positive Verdünnung  $10^{-6}$  für Isolat 882/96,  $10^{-5}$  für Isolat 4152/07 und Isolat 1834/04 und eine schwache Bande bei der Verdünnung  $10^{-7}$  für Isolat 5810/07. Diesem Ergebnis entsprechend wurden folgende Verdünnungsstufen in den Versuchen zur Optimierung der PCR eingesetzt:

882	4152	1834	5810
$10^{-6}$ - $10^{-8}$	$10^{-5}$ - $10^{-7}$	$10^{-5}$ - $10^{-7}$	$10^{-6}$ - $10^{-8}$

Die durch die veränderten PCRs erhaltenen Ergebnisse werden in Tabelle 23 dargestellt. Zu Beginn und am Ende der Untersuchungen wurden mehrere PCRs in der ursprünglichen Vorgehensweise durchgeführt, um zu überprüfen, in wie weit Unterschiede in der Bandenstärke ohne Veränderung der PCR-Durchführung auftreten.

Dabei war bei Virus 882/96 nur in einem von vier Versuchen eine Bande bei der Verdünnung  $10^{-6}$  zu sehen. In den anderen drei Versuchen war keine Bande zu erkennen. Virus 4152/07 verursachte immer eine Bande in der Verdünnung  $10^{-5}$ . In einem Fall war die Bande jedoch relativ schwach. Virus 1834/04 bewirkte zweimal eine nur schwach sichtbare Bande in der  $10^{-5}$ er Verdünnung. Im dritten Versuch stellte sich eine gut sichtbare Bande in der  $10^{-5}$ er Verdünnung dar, im vierten Versuch war keine Bande zu erkennen. Virus 5810/07 zeigte jedes Mal eine starke Bande in der Verdünnung  $10^{-6}$ . In einem Versuch war zusätzlich eine schwache Bande in der  $10^{-7}$ er Verdünnung zu erkennen. Aus diesen Ergebnissen wird ersichtlich, dass schon ohne Veränderung der Vorgehensweise gewisse Schwankungen in der Ausprägung der Ergebnisse auftreten können.

Die Ergebnisse der Optimierungsversuche zeigten in fast allen Fällen Banden innerhalb der in der ursprünglichen PCR gemessenen Streuungsbreite. Eindeutig schlechtere Ergebnisse wurden bei der Verwendung von nur 30 Zyklen oder bei dem Einsatz von nur 0,1 µl dNTPs beobachtet.

**Tabelle 23:** Angabe der höchsten Verdünnung der verwendeten Virusisolate, die eine spezifische Bande in den Versuchen zur PCR-Optimierung ergeben hat

Bezeichnung	Veränderung	Virusisolat			
		882	4152	1834	5810
Z1	ursprüngliche PCR	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	-	10 <sup>-6</sup>
Z2	ursprüngliche PCR	-	(10 <sup>-5</sup> )	(10 <sup>-5</sup> )	(10 <sup>-7</sup> )
Z3	ursprüngliche PCR	-	10 <sup>-5</sup>	(10 <sup>-5</sup> )	10 <sup>-6</sup>
Z4	0,1 µl dNTPs	-	-	-	(10 <sup>-6</sup> )
Z5	0,5 µl dNTPs	-	10 <sup>-5</sup>	-	10 <sup>-6</sup>
Z6	1 µl dNTPs	-	10 <sup>-5</sup>	-	10 <sup>-6</sup>
Z7	1,5 µl dNTPs	-	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z8	2,5 µl dNTPs	-	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z9	1,5 µl jedes Primers	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	-	(10 <sup>-6</sup> )
Z10	2,5 µl jedes Primers	-	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z11	3 µl jedes Primers	-	10 <sup>-5</sup>	-	10 <sup>-6</sup>
Z12	30 Zyklen	-	-	-	-
Z13	40 Zyklen	-	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z14	Schritt 2 Dauer 1 min	(10 <sup>-6</sup> )	10 <sup>-5</sup>	-	10 <sup>-6</sup>
Z15	Schritt 3 Dauer 1 min	(10 <sup>-6</sup> )	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z16	Schritt 4 Dauer 1 min	10 <sup>-6</sup>	(10 <sup>-5</sup> )	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z17	3 µl Probe	-	10 <sup>-5</sup>	(10 <sup>-5</sup> )	10 <sup>-6</sup>
Z18	7 µl Probe	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z19	0,5 µl MgCl <sub>2</sub>	(10 <sup>-6</sup> )	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Z20	1 µl MgCl <sub>2</sub>	(10 <sup>-6</sup> )	10 <sup>-5</sup>	-	10 <sup>-6</sup>
Z21	5 µl Q-Solution	-	10 <sup>-5</sup>	(10 <sup>-5</sup> )	(10 <sup>-7</sup> )
Z24	0,1 µl Taq Polymerase	-	10 <sup>-5</sup>	(10 <sup>-5</sup> )	10 <sup>-6</sup>
Z25	0,5 µl Taq Polymerase	-	(10 <sup>-6</sup> )	-	(10 <sup>-6</sup> )
Z26	ursprüngliche PCR	-	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>

Legende:

Angaben in Klammern: in dieser Verdünnungsstufe nur eine schwache Bande sichtbar

Häufig führten die Veränderungen nur zur verbesserten Darstellung eines einzelnen Virus. Durch die Verwendung von 0,5 µl Taq Polymerase stellte sich für Virus 4152/07 sogar eine Bande in der Verdünnung  $10^{-6}$  dar. In diesem Versuch zeigte sich für Virus 1834/04 jedoch gar keine Bande und für Virus 5810/07 nur eine schwache Bande in der Verdünnung  $10^{-6}$ . Die Viren 882/96 und 1834/04 zeigten bei Verwendung von 7 µl Probe, dem zusätzlichen Einsatz von 0,5 µl  $MgCl_2$  oder einer Verlängerung des Annealingschrittes (Schritt 3) eine verbesserte Darstellung, bei gleich bleibend guter Darstellung der Viren 4152/07 und 5810/07. Betrachtete man die Ansätze mit unterschiedlichen dNTP-Mengen genauer, so fiel auf, dass Virus 1834/04 erst ab einer Menge von 1,5 µl dNTPs eine sichtbare Bande in der  $10^{-5}$ -er Verdünnung ergab. Für die anderen drei Viren waren jedoch mit Ausnahme des Einsatzes von nur 0,1 µl dNTPs keine Unterschiede zu erkennen. Die beobachteten Verbesserungen bewegten sich jedoch alle im Rahmen der in der ursprünglichen PCR beobachteten Varianz, so dass diese Ergebnisse nicht aussagekräftig waren.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die ursprüngliche PCR (s. Punkt 3.27) zur Untersuchung beibehalten. In Fällen, in denen nur schwache oder nicht eindeutig interpretierbare Banden sichtbar waren, wurde die PCR mit einem Einsatz von 7 µl Probe wiederholt.

In der ursprünglichen PCR erfolgte das Annealing bei einer Temperatur von 51 °C. Bei der Auswahl der Annealingtemperatur wird sich an der Schmelztemperatur der beiden verwendeten Primer FV-3-MCP 4 (5'-GAC TTG GCC ACT TAT GAC-3',  $T_m$  54 °C) und FV-3-MCP 5 (5'-GTC TCT GCA GAA GAA GAA-3',  $T_m$  52 °C) orientiert.

Mittels eines Temperaturgradienten von 49 °C bis 53 °C wurde die Annealingtemperatur überprüft. Dabei zeigten sich wiederum je nach Virus unterschiedliche Ergebnisse (Tabelle 24). Die besten Ergebnisse ergaben sich bei einer Temperatur von 50,8 °C bzw. 52,9 °C. Bei diesen beiden Temperaturen waren für die Viren 4152/07 und 5810/07 starke Banden und für Virus 1834/04 eine mittelstarke Bande zu erkennen.

Niedrige Temperaturen begünstigen eine unspezifische Bindung der Primer an die DNA und können daher zu unerwünschten Amplifikaten führen. Da für Virus 1834/04 jedoch bei der höheren Temperatur von 52,9 °C schon bei einer Abweichung von 0,1 °C bzw. 0,2 °C keine Bande mehr zu erkennen war, wurde sicherheitshalber die niedrigere Temperatur von 50,8 °C für besser erachtet.

**Tabelle 24:** Ergebnisse des Temperaturgradientenlaufes

Isolat	Temperatur in °C											
	49,0	49,1	49,4	49,7	50,2	50,8	51,4	52,0	52,4	52,7	52,9	53,0
882 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4152 10 <sup>-5</sup>	-	+	+	++	(+)	++	(+)	+	++	(+)	++	+
4152 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1834 10 <sup>-5</sup>	-	(+)	+	++	(+)	+	(+)	(+)	-	-	+	-
1834 10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5810 10 <sup>-6</sup>	+	+	++	-	+	++	+	+	(+)	+	++	+
5810 10 <sup>-7</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legende:

- : keine Bande
- (+) : schwache Bande
- + : mittelstarke Bande
- ++ : starke Bande

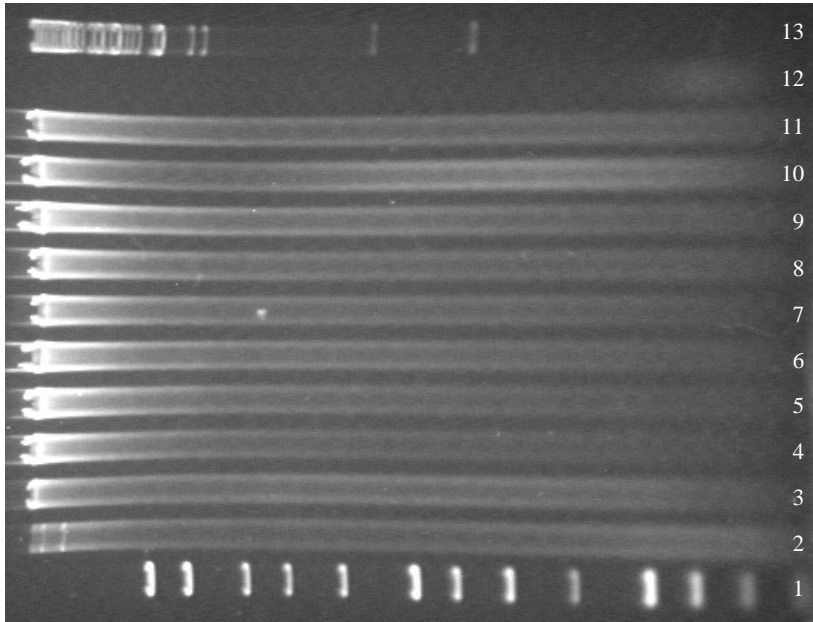
#### **4.9 Restriktionsenzymanalyse**

Die DNA der zehn Virusisolate sowie DNA aus einer unbeimpften TH-1-Zellkultur als Kontrolle wurden mit den Restriktionsenzymen MspI, EcoRI, HindIII, XbaI und KpnI gespalten. Zum Abschätzen der Fragmentgrößen wurden ein 1kb-DNA-Marker sowie der Marker XV ebenfalls auf das Gel aufgetragen. Der Restriktionsansatz der Zellkulturkontrolle ergab keine erkennbaren Banden, so dass in den Virusrestriktionen keine Fehlbanden durch Zellreste zu befürchten waren.

Die Spaltungen mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII, XbaI und KpnI lieferte mehrere gut abgrenzbare Banden. Bei der Spaltung mit dem Enzym MspI entstand eine große Anzahl sehr kleiner Fragmente, die sich durch die Gelelektrophorese nicht deutlich darstellen ließen. Die Spaltung mit MspI wurde daher nicht in die Auswertung einbezogen.

Die Restriktionen wurden mehrfach wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Bandenmuster zu bestätigen. Die Banden stellten sich umso schwächer dar, je kürzer die Fragmentstücke waren. Nur deutlich differenzierbare Banden wurden in die Analyse einbezogen. Aufgrund dieser Tatsache wurden Fragmente, die kürzer als 200 bp waren, vernachlässigt.

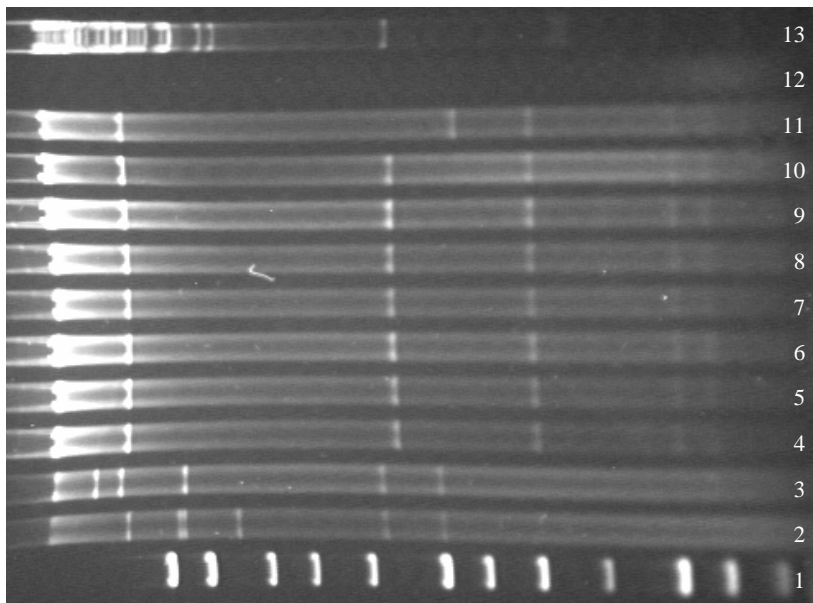
Restriktionsenzym EcoRI spaltete nur die DNA von Virus FV-3 in drei verschiedene Fragmente (Abbildung 18). Die DNA der anderen neun Viren wurde nicht gespalten.



**Abbildung 18:** Spaltung der DNA mit EcoRI

Spur 1: 1kb-DNA-Marker, Spur 2: Virus FV-3, Spur 3: Virus 1834/04, Spur 4: Virus 354/08, Spur 5: Virus 4152/07, Spur 6: Virus 5187/07, Spur 7: Virus 5810/07, Spur 8: Virus CU10/08, Spur 9: Virus 6172/07, Spur 10: Virus CU60/09, Spur 11: Virus 882/96, Spur 12: Zellkulturkontrolle, Spur 13: Marker XV

Die Viren-DNA wurde von HindIII in vier bis sieben Fragmente gespalten (Abbildung 19). Dabei zeigten die Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07 und CU60/09 dasselbe Bandenmuster. Virus 882/96 unterschied sich von dem Bandenmuster der vorher genannten Viren in nur zwei Fragmenten. Die beiden Amphibienviren FV-3 und 1834/04 zeigten ein sowohl von den Reptilenviren als auch untereinander deutlich unterscheidbares Bandenmuster.



**Abbildung 19:** Spaltung der DNA mit HindIII

Spur 1: 1kb-DNA-Marker, Spur 2: Virus FV-3, Spur 3: Virus 1834/04, Spur 4: Virus 354/08, Spur 5: Virus 4152/07, Spur 6: Virus 5187/07, Spur 7: Virus 5810/07, Spur 8: Virus CU10/08, Spur 9: Virus 6172/07, Spur 10: Virus CU60/09, Spur 11: Virus 882/96, Spur 12: Zellkulturkontrolle, Spur 13: Marker XV



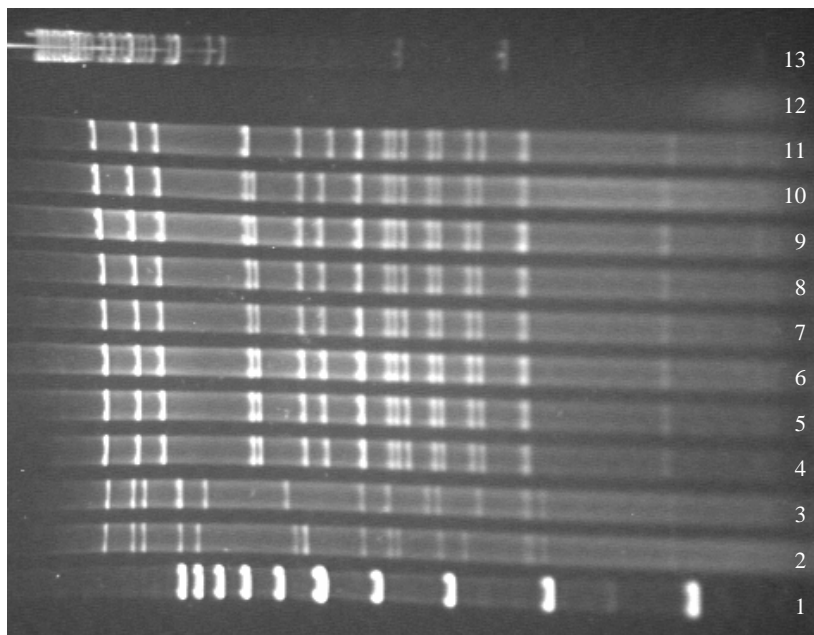
Durch das Restriktionsenzym XbaI wurde die Viren-DNA in 11 bis 14 unterschiedlich große Fragmente gespalten (Abbildung 20). Die Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08 und CU60/09 zeigten dasselbe Bandenmuster. Virus 882/96 unterschied sich von dem Bandenmuster der vorher genannten Viren in nur einem Fragment. Virus 6172/07 zeigte zwei unterschiedliche Fragmente. Die Viren FV-3 und 1834/04 zeigten wiederum deutlich unterscheidbare Bandenmuster.



**Abbildung 20:** Spaltung der DNA mit XbaI

Spur 1: 1kb-DNA-Stufen-Marker, Spur 2: Virus FV-3, Spur 3: Virus 1834/04, Spur 4: Virus 354/08, Spur 5: Virus 4152/07, Spur 6: Virus 5187/07, Spur 7: Virus 5810/07, Spur 8: Virus CU10/08, Spur 9: Virus 6172/07, Spur 10: Virus CU60/09, Spur 11: Virus 882/96, Spur 12: Zellkulturkontrolle, Spur 13: Marker XV

Restriktionsenzym KpnI spaltete die Viren-DNA in 13 bis 16 unterschiedlich große Fragmente (Abbildung 21). Die Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07 und CU60/09 zeigten dasselbe Bandenmuster. Virus 882/96 unterschied sich in fünf Fragmenten von den vorher genannten Viren. Die Viren FV-3 und 1834/04 wiesen ein deutlich anderes Bandenmuster auf.



**Abbildung 21:** Spaltung der DNA mit KpnI

Spur 1: 1kb-DNA-Stufen-Marker, Spur 2: Virus FV-3, Spur 3: Virus 1834/04, Spur 4: Virus 354/08, Spur 5: Virus 4152/07, Spur 6: Virus 5187/07, Spur 7: Virus 5810/07, Spur 8: Virus CU10/08, Spur 9: Virus 6172/07, Spur 10: Virus CU60/09, Spur 11: Virus 882/96, Spur 12: Zellkulturkontrolle, Spur 13: Marker XV

Die Fragmentgrößen wurden anhand der gleichfalls aufgetragenen DNA-Marker abgeschätzt (Tabellen 38-41 im Anhang). Anhand dieser Tabellen wurde die prozentuale Übereinstimmung des Bandenmusters errechnet (Abbildung 24-Abbildung 27 im Anhang). Von den aus den vier verschiedenen Restriktionsansätzen erhaltenen prozentualen Übereinstimmungen wurde der arithmeti-

sche Mittelwert gebildet (Abbildung 22). Die Bandenmuster der Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08 und CU60/09 stimmten zu 100 % überein. Das Bandenmuster von Virus 6172/07 zeigte eine 96,3 %ige Übereinstimmung mit dem Bandenmuster dieser Virusgruppe. Virus 882/96 wies eine 81 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters zu dieser Virusgruppe auf. Virus 6172/07 und Virus 882/96 zeigten untereinander eine 77,3 %ige Übereinstimmung ihres Bandenmusters. Die beiden von Amphibien stammenden Viren FV-3 und 1834/04 wiesen eine viel geringere Übereinstimmung sowohl untereinander als auch im Vergleich zu den von Reptilien stammenden Viren auf. Virus FV-3 zeigte eine 22,3 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters mit den Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07 und CU60/09 und eine 25,3 %ige Übereinstimmung mit Virus 882/96. Mit Virus 1834/04 stimmten 37,8 % des Bandenmusters von Virus FV-3 überein. Virus 1834/04 wies eine 32 %ige Übereinstimmung des Bandenmusters mit den Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07 und CU60/09 und eine 33,3 %ige Übereinstimmung mit Virus 882/96 auf.

FV-3	100										
1834	37,8	100									
354	22,3	32	100								
4152	22,3	32	100	100							
5187	22,3	32	100	100	100						
5810	22,3	32	100	100	100	100					
CU10	22,3	32	100	100	100	100	100				
6172	22,3	32	96,3	96,3	96,3	96,3	96,3	100			
CU60	22,3	32	100	100	100	100	100	96,3	100		
882	25,3	33,3	81	81	81	81	81	77,3	81	100	
	FV-3	1834	354	4152	5187	5810	CU10	6172	CU60	882	

**Abbildung 22:** Arithmetische Mittelwerte der prozentualen Übereinstimmung der durch die vier Restriktionen erhaltenen Bandenmuster

#### 4.10 Sequenzanalyse

Nach Bearbeitung der erhaltenen Gensequenzen mit der Sequencing Analysis 5.3.1-Software und dem Vergleich der beiden komplementären DNA-Stränge, stand für jedes der zehn untersuchten Isolate eine 484 bp lange Gensequenz zum Vergleich bereit. Von den Viren FV-3 und 1834/04 sind die Gensequenzen bereits in DNA-Sequenzdatenbanken hinterlegt. Durch den Vergleich der erhaltenen Gensequenz mit der bereits hinterlegten Sequenz konnte die korrekte Durchführung der Sequenzierungsreaktion überprüft werden. Der Vergleich der erhaltenen Sequenz des Virus FV-3 zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung mit einem Teil des Major Capsid Protein Gens von FV-3 (FJ459783.1, GQ144408.1, FJ601916.1, AY548484.1 und anderen). Diese Sequenz entsprach den Basen 77 bis 561 des MCP (MAO et al., 1996). Die erhaltene Sequenz des Virus 1834/04 entsprach zu 100 % der schon von PASMANS et al. (2008) gelesenen Sequenz (DQ192530.1). Dieses bestätigte den korrekten Ablauf der Sequenzierungsreaktion.

Das sequenzierte Genstück der beiden Viren FV-3 und 1834/04 wies eine Übereinstimmung von 99,8 % auf. Der Vergleich der übrigen acht Viren (354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07, CU60/09 und 882/96) untereinander zeigte eine 100 %ige Übereinstimmung der Gensequenz. Der Vergleich dieser Viren mit Virus FV-3 zeigte eine 98,6 %ige Übereinstimmung und mit Virus 1834/04 eine 98,3 %ige Übereinstimmung der Basenfolge. Der Vergleich der Sequenz dieser Virengruppe mit in den Datenbanken enthaltenen Sequenzen ergab eine maximale Übereinstimmung von 98,8 % mit dem MCP-Gen des *Rana catesbeiana* virus JP (AB474588.1), des FV-3 Isolat NT628 (GQ144407.1), des Soft-shelled turtle iridovirus (EU627010.1) und des Iridovirus RGV-9806 (AF192509.1).

Abbildung 23 zeigt das Alignment der zehn untersuchten Sequenzen miteinander. Die Gensequenz von Virus FV-3 wird mit Buchstaben entsprechend der einzelnen Basen dargestellt. Bei den Gensequenzen der anderen Viren stehen Punkte für Übereinstimmungen. Ist in der Gensequenz eine andere Base vorhanden, wird sie mit dem einsprechenden Buchstaben abgebildet. Es wird deutlich, dass in dieser 484 bp langen Sequenz beim Vergleich der Viren FV-3 und

1834/04 nur eine unterschiedliche Base vorhanden war. Die Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07, CU60/09 und 882/96 zeigten im Vergleich zu Virus FV-3 insgesamt sieben verschiedene Basen.

FV-3	1	TGAGAGAGCAATGTACGGGGGTTCCGGACGCCACCACGTA	60
1834		.....	
354		.....	
4152		.....	
5187		.....	
5810		.....	
CU10		.....	
6172		.....	
CU60		.....	
882		.....	
FV-3	61	CGTGGGGTGGTTCACCAAGCTGCCGTCTCTGGCTGCCAAGATGTCGGGTAACCCGGCTTT	120
1834		.....	
354		..... CA. A ..... C.	
4152		..... CA. A ..... C.	
5187		..... CA. A ..... C.	
5810		..... CA. A ..... C.	
CU10		..... CA. A ..... C.	
6172		..... CA. A ..... C.	
CU60		..... CA. A ..... C.	
882		..... CA. A ..... C.	
FV-3	121	CGGGCAGCAGTTTTCCGGTCGGCGTTCCCAGGTCGGGGGATTACATCCTCAACGCCTGGTT	180
1834		.....	
354		.....	
4152		.....	
5187		.....	
5810		.....	
CU10		.....	
6172		.....	
CU60		.....	
882		.....	
FV-3	181	GGTGCTCAAGACCCCGAGGTCGAGCTCCTGGCTGCAAACCGAGCTGGGAGACAATGGCAC	240
1834		.....	
354		..... C	
4152		..... C	
5187		..... C	
5810		..... C	
CU10		..... C	
6172		..... C	
CU60		..... C	
882		..... C	
FV-3	241	CATCAGTGGACAAAGAACCCCATGCACAACATTGTGGAGAGCGTCACCCCTCTCATTCAA	300
1834		.....	
354		..... T	
4152		..... T	
5187		..... T	
5810		..... T	
CU10		..... T	
6172		..... T	
CU60		..... T	
882		..... T	

**Abbildung 23:** Alignment der Sequenzen der zehn Virusisolate

FV-3	301	CGACATCAGCGCCCAGTCCTTTAACACGGCATACTGGACGCCTGGAGCGAGTACACCAT	360
1834		.....	
354		.....	
4152		.....	
5187		.....	
5810		.....	
CU10		.....	
6172		.....	
CU60		.....	
882		.....	
FV-3	361	GCCAGAGGCCAAGCGCACAGGCTACTATAACATGATAGGCCAACACCAGCGATCTCATCAA	420
1834		.....A.....	
354		.....T.....	
4152		.....T.....	
5187		.....T.....	
5810		.....T.....	
CU10		.....T.....	
6172		.....T.....	
CU60		.....T.....	
882		.....T.....	
FV-3	421	CCCCGCCCCGGCCACAGGCCAGGACGGAGCCAGGGTCCTCCCGGCCAAGAACCTGGTTCT	480
1834		.....	
354		.....	
4152		.....	
5187		.....	
5810		.....	
CU10		.....	
6172		.....	
CU60		.....	
882		.....	
FV-3	481	TCCC	484
1834		....	
354		....	
4152		....	
5187		....	
5810		....	
CU10		....	
6172		....	
CU60		....	
882		....	

**Abbildung 23:** Fortsetzung

#### 4.11 Epidemiologische Untersuchungen zum Krankheitsverlauf in den Beständen

In den Rachenabstrichen der sieben Schildkröten („Minni“, „Fips“, „Möppi“, „Kia-  
ra“, „Pünktchen“, „Sternchen“ und „Maya“) aus **Bestand M** ließen sich zu kei-  
nem der beiden Untersuchungszeitpunkte (20.2.2008 und 25.11.2009) Ranavi-  
ren mit Hilfe von PCR oder TH-1-Zellkultur feststellen.

Aus **Bestand B** waren am 18.12.2007 Rachen- und Kloakentupferproben von 18 Schildkröten eingeschickt worden. Bei allen 18 Schildkröten ließ sich in mindestens einer Tupferprobe Ranavirusgenom mit Hilfe der PCR nachweisen (Tabelle 25). In der TH-1-Zellkultur wurde jedoch kein Ranavirus-typischer CpE hervorgerufen.

**Tabelle 25:** PCR-Ergebnisse der Tupferproben B1.1-B1.18

		B1.X																	
X:		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
R		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
K		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

Legende:

R: Rachentupferprobe, K: Kloakentupferprobe

+ : Ranavirusgenom nachgewiesen

- : Ranavirusgenom nicht nachgewiesen

In den Rachen- und Kloakentupferproben der drei Schildkröten vom 11.2.2008, der vier Schildkröten vom 27.2.2008 und der sechs Schildkröten vom 16.3.2008 ließen sich weder mit Hilfe der PCR noch mittels TH-1-Zellkultur Ranavirus nachweisen.

Bei *Testudo marginata* „Mara“ (F1.1) aus **Bestand F** wurde in den Rachen- und Kloakentupferproben vom 17.12.2007 Ranavirusgenom mittels PCR nachgewiesen. Bei einer *Testudo hermanni* (F2.1) konnte Ranavirusgenom nur in der Kloakentupferprobe mit Hilfe der PCR nachgewiesen werden. Nach Verimpfung auf TH-1-Zellkultur zeigte sich weder bei der Rachen- noch bei der Kloakentupferprobe ein Ranavirus-typischer CpE. Die Rachen- und Kloakentupferproben von jeweils vier Schildkröten pro Einsendung (15.1.2008, 18.2.2008 und 24.2.2008) waren alle negativ in der Untersuchung auf Ranavirus mit Hilfe von PCR und TH-1-Zellkultur.

Die Rachen- und Kloakentupferproben (E3.1-40 und E4.1-3) aus **Bestand E** waren bis auf E3.38 alle negativ in der Untersuchung auf Ranavirus mittels PCR und TH-1-Zellkultur. In der Rachen- und Kloakentupferprobe von *Testudo hermanni* E3.38 ließ sich mittels PCR Ranavirusgenom nachweisen. In der TH-1-Zellkultur war jedoch kein Ranavirus-typischer CpE zu erkennen.

In allen untersuchten Rachen- und Kloakentupferproben (H1.1 und H2.1-21) aus **Bestand H** ließ sich weder mit Hilfe der PCR noch mit der TH-1-Zellkultur Ranavirus nachweisen.

#### 4.12 Schildkröten zur detaillierten Untersuchung

Am 13.11.2008 erhielt ich zwei Schildkröten aus Bestand E zur weiteren Beobachtung und Untersuchung. Eine Schildkröte war ein 1.160 g schweres *Testudo marginata*-Männchen (CU60/09). Die zweite Schildkröte war ein 940 g schweres *Testudo hermanni*-Weibchen („Gertrude“). Beide Schildkröten hatten vorberichtlich Symptome einer Ranavirusinfektion gezeigt. „Gertrude“ war schon seit mehreren Wochen schwer erkrankt. Zum Zeitpunkt der Übergabe befanden sich beide Schildkröten schon in Winterruhe. Adspektorisch waren zu diesem Zeitpunkt keine Auffälligkeiten feststellbar. Beide Schildkröten wurden daraufhin bis zum 15.3.2009 im Kühlschrank überwintert. Nach Ende der Winterruhe wurden beide Schildkröten in getrennten Terrarien bzw. Außengehegen gehalten.

Das *Testudo marginata*-Männchen (CU60/09) war nach Ende des Winterschlafs munter. Ab dem 23.3.2009 wurde es zunehmend ruhiger. Zwei Tage später war klarer Schleim vorm Maul und geschwollene Augenlider zu sehen und Atemgeräusche zu hören. Es lag mit herausgestrecktem Kopf matt am Boden. Am 27.3.2009 trat zusätzlich eine Schwellung des rechten Vorderbeins auf. CU60/09 wurde mit Marbofloxacin (5 mg/kg KGW), Rimadyl (5 mg/kg KGW) und Ringer-Glukose-Infusion (20 ml) behandelt. Sein Befinden verschlechterte sich jedoch weiter, so dass es am 31.3.2009 eingeschläfert wurde.

Das *Testudo hermanni*-Weibchen „Gertrude“ zeigte sich nach Ende der Winterruhe ruhig und nahm kein Futter auf. Zur Unterstützung wurden alle ein bis zwei



Tage Ringer-Glukose-Infusionen (12 ml) verabreicht. Am 1.4.2009 waren weißliche Beläge auf dem rostralen Bereich der Zunge zu sehen ( $\varnothing$  ca. 2 mm). Daraufhin wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen alle zwei Tage Marbofloxacin (5 mg/kg KGW) injiziert. Am 5.4.2009 waren keine Beläge mehr auf der Zunge zu sehen und „Gertrude“ wurde munterer. Ab dem 15.4.2009 nahm sie gelegentlich etwas Futter auf. Ihr Zustand besserte sich weiterhin, so dass sie ab dem 30.4.2009 eine gute Futteraufnahme bei ungestörtem Allgemeinbefinden zeigte. Daraufhin wurden die Ringer-Glukose-Infusionen eingestellt. Aufgrund des Sektionsbefundes der Schildkröte CU60/09 wurde „Gertrude“ am 1.5.2009 und am 21.5.2009 mit Panacur (100 mg/kg KGW) entwurmt. Am 4.6.2009 fiel auf, dass die rostrale Hälfte des Unterkiefers (Hornschnabel, rostraler Teil der Mandibula und umliegendes Gewebe) fehlte. Das offenliegende Gewebe zeigte keine Anzeichen einer akuten Verletzung. Es waren lediglich zwei petechiale Rötungen in der Mitte der nun offenliegenden Mandibulafäche zu sehen. Ansonsten zeigte „Gertrude“ weiterhin ein vollkommen ungestörtes Allgemeinbefinden. Da sie nun nicht mehr in der Lage war, Futterstücke abzubeißen, wurde das Futter in kleinen Stückchen gereicht. Diese nahm sie bereitwillig auf.

Am 17.6.2009 erhielt ich wiederum zwei Schildkröten aus Bestand E. Das 980 g schwere *Testudo hermanni*-Weibchen „Agatha“ war vorberichtlich unauffällig gewesen. Bei einer Kontrolle der Maulhöhle durch den Besitzer waren jedoch Beläge aufgefallen. Das 640 g schwere *Testudo hermanni*-Männchen „Klaus“ war vorberichtlich schon mehrmals erkrankt.

„Agatha“ zeigte zum Zeitpunkt der Übergabe ein vollkommen ungestörtes Allgemeinbefinden. „Klaus“ zeigte sich bei der Übergabe matt. Das rechte Auge tränkte und war geschlossen. Im Maul waren weißliche Beläge auf der Zunge zu sehen. „Klaus“ zeigte zu diesem Zeitpunkt Maulatmung. Daraufhin wurde er mit Ringer-Glukose-Lösung (6 ml) infundiert. Er war weiterhin matt und zeigte keine Futteraufnahme. Die Symptome am Auge verschwanden jedoch bis zum 22.6.2009. Ab dem 28.6.2009 zeigte auch „Klaus“ ein ungestörtes Allgemeinbefinden mit selbstständiger Futteraufnahme. Gelegentlich war etwas Schleim im rechten Augenwinkel zu sehen.

Die drei Schildkröten „Gertrude“, „Agatha“ und „Klaus“ wurden ab dem 1.7.2009 gemeinsam in einem Gehege gehalten. Anfang Oktober wurden alle drei mit Panacur (100 mg/kg KGW) entwurmt. Am 24.10.2009 wurden sie zur Winterruhe im Kühlschrankschrank untergebracht. Dabei fiel auf, dass sich bei „Gertrude“ ein kleines Stück Horn ( $\varnothing$  ca. 1 cm) im kaudalen Bereich des Plastrons gelöst hatte.

Von allen vier Schildkröten wurden im Abstand von ca. ein bis zwei Wochen Rachen- und Kloakentupferproben genommen und mit Hilfe von PCR und TH-1-Zellkultur auf das Vorhandensein von Ranavirus untersucht. Zusätzlich wurde am 24.10.2009 bei „Gertrude“ das abgelöste Stück Horn vom Plastron untersucht. Am 4.11.2009 wurde von den drei verbliebenen Schildkröten Geschabsel und Tupferproben von dem Panzer sowie der Haut genommen. Bei „Gertrude“ wurde dabei die Stelle, an der sich das Stück Horn gelöst hatte, in die Probe einbezogen. Außerdem wurden Rachen- und Kloakentupferproben von „Gertrude“ gewonnen. Am 16.11.2009 wurden abermals Tupferproben von Panzer und Haut untersucht. Von „Gertrude“ wurden zwei Tupferproben, eine von der Stelle mit dem abgelösten Horn und eine von unversehrtem Gewebe, genommen.

In keiner der untersuchten Proben ließ sich mit Hilfe der TH-1-Zellkultur Ranavirus isolieren. Ein Überblick über die Ergebnisse mittels PCR-Untersuchung wird in den Tabelle 26 und Tabelle 27 gegeben. Bei „Gertrude“ ließ sich bis zum 15.6.2009 Ranavirusgenom in den Rachentupferproben und bis zum 20.4.2009, mit Ausnahme der Probe vom 19.3.2009, in den Kloakentupferproben nachweisen. Sowohl in dem Hornstück als auch in den Proben von der beschädigten Plastronstelle ließ sich Ranavirusgenom dokumentieren. In allen untersuchten Tupferproben von Schildkröte CU60/09 ließ sich Ranavirusgenom mittels PCR nachweisen. Bei „Agatha“ fand sich nur in den ersten beiden Rachentupferproben (22.6.2009 und 30.6.2009) Ranavirusgenom. Bis zum 19.8.2009, mit Ausnahme des 11.8.2009, ließ sich in den Rachentupferproben von „Klaus“ und bis zum 30.6.2009 in den Kloakentupferproben Ranavirusgenom nachweisen.

**Tabelle 26:** Ergebnisse der Untersuchung der Rachen- und Kloakentupferproben mittels Rana-virus-spezifischer PCR

Datum	GR	GK	CU60R	CU60K	AR	AK	KR	KK				
18.11.08	+	+	+	+								
19.3.09	+	-	+	+								
31.3.09	+	+	+	+								
7.4.09	+	+										
14.4.09	+	+										
20.4.09	+	+										
27.4.09	+	-										
5.5.09	+	-										
11.5.09	+	-										
18.5.09	+	-										
25.5.09	+	-										
2.6.09	+	-										
8.6.09	+	-										
15.6.09	+	-										
22.6.09	-	-							+	-	+	+
30.6.09	-	-							+	-	+	+
12.7.09	-	-							-	-	+	-
30.7.09	-	-							-	-	+	-
11.8.09	-	-							-	-	-	-
19.8.09	-	-							-	-	+	-
3.9.09	-	-			-	-	-	-				
17.9.09	-	-			-	-	-	-				
6.10.09	-	-			-	-	-	-				
24.10.09	-	-			-	-	-	-				

Legende:

1. Buchstabe: G: „Gertrude“, A: „Agatha“, K: „Klaus“
  2. Buchstabe: R: Rachentupferprobe; K: Kloakentupferprobe
- + : Rana-virusgenom nachgewiesen  
 - : Rana-virusgenom nicht nachgewiesen

**Tabelle 27:** Ergebnisse der Untersuchung zusätzlicher Proben mittels Ranavirus-spezifischer PCR

Datum	Material	„Gertrude“	„Agatha“	„Klaus“
24.10.09	Hornstück	+		
4.11.09	Rachentupfer	-		
4.11.09	Kloakentupfer	-		
4.11.09	Hautgeschabsel („Gertrude“: inklusive Plastronverletzung)	+	-	-
4.11.09	Hauttupfer („Gertrude“: inklusive Plastronverletzung)	+	-	-
16.11.09	Hauttupfer („Gertrude“: exklusive Plastronverletzung)	-	-	-
16.11.09	Tupfer von Plastronverletzung	+		

Legende:

- + : Ranavirusgenom nachgewiesen
- : Ranavirusgenom nicht nachgewiesen

Da die Ergebnisse der PCR nicht durch die Zellkultur bestätigt werden konnten, wurden einige PCR-Amplifikate sequenziert, um die Ergebnisse der PCR durch eine zweite Methode zu verifizieren. Zu diesem Zweck wurden von „Gertrude“ die Rachentupferproben vom 14.4.2009 und 25.5.2009, die Kloakentupferprobe vom 20.4.2009, das Hornstück vom 24.10.2009, die Tupferprobe von der Plastronverletzung vom 16.11.2009, von „Agatha“ die Rachentupferprobe vom 30.6.2009 und von „Klaus“ die Rachen- und Kloakentupferprobe vom 30.6.2009 ausgewählt.

Alle acht Amplifikate zeigten eine 100 %ige Übereinstimmung ihrer Basenpaarfolge mit Virus CU60/09 und somit eine 98,6 %ige Übereinstimmung mit Virus FV-3 (s. Punkt 4.10).

**4.13 Entwicklung der Antikörpertiter einzelner Tiere (positive Proben)**

„Minni“

*Testudo hermanni*-Weibchen „Minni“ wurde am 23.7.2007 beim Haustierarzt aufgrund von Nasenausfluss und Belägen in der Maulhöhle vorgestellt (s. Punkt 3.12). Zwei Wochen später verschwanden die Symptome und sie zeigte ein ungestörtes Allgemeinbefinden. In einer Rachentupferprobe vom 20.2.2008 ließ sich kein Ranavirus nachweisen. Zwei Seren wurden von „Minni“ untersucht. Das erste Serum (M1.1) wurde ein knappes Jahr nach Beginn der Erkrankung gewonnen. Das zweite Serum (M2.1) wurde mehr als zwei Jahre nach Beginn der Erkrankung gewonnen. In beiden Seren ließen sich Ranavirusantikörper nachweisen (Tabelle 28). Das zeitlich später gewonnene Serum wies einen deutlich höheren Antikörpertiter auf. Zu diesem Zeitpunkt war zusätzlich eine Rachentupferprobe mitgeschickt worden, in der jedoch Ranavirus nicht nachgewiesen werden konnte.

**Tabelle 28:** Antikörpertiter der Seren von „Minni“

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
M1.1	18.7.08	9,92	2,48
M2.1	25.11.09	37,94	18,97

„Fips“

*Testudo hermanni*-Weibchen „Fips“ wurde am 4.8.2007 beim Haustierarzt aufgrund von zögerlichem Fressen vorgestellt (s. Punkt 3.12). Es konnten keine weiteren Symptome festgestellt werden und acht Wochen später nahm dieses Weibchen wieder selbstständig Futter auf. In einer Rachentupferprobe vom 20.2.2008 konnte kein Ranavirus nachgewiesen werden. Von „Fips“ wurden zu denselben Zeitpunkten wie bei „Minni“ zwei Seren eingeschickt. Das erste Serum (M1.2) ergab einen ELISA-Wert im fraglichen Bereich (Tabelle 29). Im zweiten Serum (M2.2) ließen sich eindeutig Ranavirusantikörper nachweisen. In

der zu diesem Zeitpunkt mitgeschickten Rachentupferprobe ließ sich kein Rana-virus nachweisen.

**Tabelle 29:** Antikörpertiter der Seren von „Fips“

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
M1.2	18.7.08	4,38	1,35
M2.2	25.11.09	12,71	3,43

### E2.1

Die *Testudo hermanni* E2.1 erkrankte im Juli/August 2008 vier Wochen lang mit eitriger Stomatitis (s. Punkt 3.12). Am 23.9.2008 wurde Serum (E2.1) eingeschickt. In diesem Serum ließ sich ein niedriger Antikörpertiter nachweisen (Tabelle 30). Diese Schildkröte erkrankte später nochmals und starb.

**Tabelle 30:** Antikörpertiter des Serums von E2.1

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
E2.1	23.9.08	2,26	1,8

### E3.38

Das *Testudo hermanni*-Weibchen E3.38 gehörte zu dem Altbestand des Bestand E (s. Punkt 3.12). Alle Schildkröten dieser Gruppe erkrankten an den Folgen einer Rana-virusinfektion. Die meisten Schildkröten starben. Diese *Testudo hermanni* überlebte und erholte sich wieder vollständig. Von dieser Schildkröte wurden zweimal Serumproben sowie Rachen- und Kloakentupferproben untersucht. In dem ersten Serum vom 9.7.2009 ließen sich keine Rana-virusantikörper nachweisen (Tabelle 31). Zu diesem Zeitpunkt war jedoch Rana-virusgenom mittels PCR in den Rachen- und Kloakentupferproben nachweisbar. In dem zweiten Serum vom 20.9.2009 waren Rana-virusantikörper nachweisbar. Zu

dieser Zeit ließ sich in den Rachen- und Kloakentupferproben Ranavirus nicht nachweisen.

**Tabelle 31:** Antikörpertiter der Seren von E3.38

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
E3.38	9.7.09	1,26	1,00
H2.18	20.9.09	8,35	2,58

E3.39

Das *Testudo hermanni*-Männchen E3.39 war die einzige überlebende Schildkröte einer Gruppe von Jungtieren (s. Punkt 3.12). Alle Jungtiere dieser Gruppe erkrankten mit den Symptomen einer Ranavirusinfektion. Dieses Männchen überlebte als einziges und zeigte zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein vollständig ungestörtes Allgemeinbefinden. Von dieser Schildkröte wurden ebenfalls zwei Seren sowie Rachen- und Kloakentupferproben untersucht. Die ersten Proben (E3.39) wurde am 9.7.2009 gewonnen, die zweiten (H2.19) am 20.9.2009. In beiden Seren ließ sich ein hoher Gehalt an Ranavirusantikörpern nachweisen (Tabelle 32). In dem zweiten Serum war der Gehalt ein wenig höher. Zu beiden Zeitpunkten ließ sich weder in den Rachen- noch in den Kloakentupferproben Ranavirus nachweisen.

**Tabelle 32:** Antikörpertiter der Seren von E3.39

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
E3.39	9.7.09	23,20	9,11
H2.19	20.9.09	30,23	11,90

„Gertrude“

*Testudo hermanni* Weibchen „Gertrude“ erkrankte schwer im Herbst 2008. Erst ab April 2009 zeigte sie wieder ein ungestörtes Allgemeinbefinden. Bis zum 15.6.2009 ließ sich Ranavirusgenom mit Hilfe der PCR in Rachtentupferproben nachweisen. Im Oktober und November 2009 gelang der Ranavirusnachweis mittels PCR in Proben von einer Plastronverletzung (s. Punkt 4.12). Von „Gertrude“ wurden im Laufe des Jahres 2009 insgesamt viermal Serumproben gewonnen. In allen vier Serumproben ließen sich Ranavirusantikörper nachweisen (Tabelle 33). Die Antikörpertiter der untersuchten Proben stiegen im zeitlichen Verlauf an.

**Tabelle 33:** Antikörpertiter der Seren von „Gertrude“

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
G1	12.5.09	12,69	4,88
G2	30.6.09	23,89	8,39
G3	3.9.09	28,10	12,04
G4	15.10.09	29,00	14,35

„Agatha“

*Testudo hermanni*-Weibchen „Agatha“ zeigte bis auf eine kurze Zeit im Juni 2009 vorhandenen Belägen in der Maulhöhle keine Symptome einer Ranavirusinfektion. Bis zum 30.6.2009 ließ sich Ranavirusgenom in Rachtentupferproben von „Agatha“ nachweisen (s. Punkt 4.12). Die erste Serumprobe vom 30.6.2009 zeigte einen Antikörpertiter im fraglichen Bereich (Tabelle 34). In den beiden folgenden Serumproben ließen sich Ranavirusantikörper mit jeweils steigendem Titer nachweisen.



**Tabelle 34:** Antikörpertiter der Seren von „Agatha“

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
A1	30.6.09	2,05	1,14
A2	3.9.09	11,07	3,48
A3	15.10.09	15,21	4,52

„Klaus“

*Testudo hermanni*-Männchen „Klaus“ erkrankte vorberichtlich mehrmals. Erst ab Ende Juni 2009 zeigte er ein dauerhaft ungestörtes Allgemeinbefinden. Bis zum 19.8.2009 ließ sich Ranavirusgenom in Rachentupferproben von „Klaus“ nachweisen. Alle drei von „Klaus“ im Jahr 2009 gewonnenen Serumproben zeigten einen nachweisbaren Gehalt an Ranavirusantikörpern (Tabelle 35). Die Antikörpertiter stiegen mit dem zeitlichen Verlauf an.

**Tabelle 35:** Antikörpertiter der Seren von „Klaus“

Serum	Datum	ELISA-Wert der Serumverdünnung	
		1:10	1:100
K1	30.6.09	6,06	2,42
K2	3.9.09	18,97	5,57
K3	15.10.09	21,55	7,49

Bilanz

Bei allen Schildkröten, die an den Folgen einer Ranavirusinfektion erkrankten und wieder genesen, ließen sich nach einiger Zeit (1-27 Monate nach Beginn der Erkrankung) Ranavirusantikörper feststellen. Bei allen sieben Schildkröten, von denen mehrmals Serumproben untersucht wurden, waren steigende Antikörpertiter nachweisbar. Es konnten bis zu zwei Jahre nach Auftreten der Erkrankung Ranavirusantikörper dokumentiert werden (s. „Minni“ und „Fips“). Für einen längeren Zeitraum stehen noch keine Ergebnisse zur Verfügung. Die An-

tikörper ließen sich zum Teil erst detektieren, nachdem mittels PCR kein Ranavirusgenom mehr nachweisbar war (s. E3.38) und zum Teil schon während eines positiven PCR-Nachweises (s. „Gertrude“ und „Klaus“). Bei einer weiteren Schildkröte („Agatha“) war während des positiven Ranavirusnachweis mittels PCR nur ein Antikörpertiter im fraglichen Bereich belegbar.

#### **4.14 Versuche zur Optimierung der Zellkulturnachweise**

Bei den Untersuchungen der Tupferproben fiel auf, dass keine einzige der untersuchten Tupferproben einen Ranavirus-typischen cpE in der TH-1-Zellkultur hervorrief, obwohl in einer nicht geringen Anzahl von Proben Ranavirusgenom mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Bei der Untersuchung der Organe der Sektionstiere zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei exemplarischer Betrachtung der Schildkröten der Gruppe CU8/08-CU13/08 (Tabelle 5 und Tabelle 6, Punkt 3.12) fällt auf, dass in 45 von insgesamt 57 Organproben Ranavirusgenom mittels PCR nachweisbar war. Nach Verimpfung auf TH-1-Zellkultur zeigte sich jedoch nur bei 10 Proben ein Ranavirus-typischer cpE. Aus diesem Grund wurden verschiedene Ansätze überprüft, um die Nachweisrate in der TH-1-Zellkultur zu erhöhen.

Vor dem Einsatz in die Zellkultur wurden die Proben im Gegensatz zu der Untersuchung mittels PCR durch einen Filter mit einer mittleren Porengröße von 0,2 µm filtriert, um die Zellkultur-störenden Bakterien und Pilze zu entfernen. Wie unter Punkt 4.3 nachgewiesen wurde, geht durch die Filtration eine große Anzahl der Viruspartikel verloren. Um diesen Verlust zu umgehen, wurde ein Teil der Tupferproben von „Gertrude“, „Agatha“ und „Klaus“ nicht wie gewöhnlich in PBS sondern in Anzuchtmedium verbracht. In dem Anzuchtmedium ist Gentamycin (10 mg/ml) und Amphotericin B (10 mg/ml) enthalten. Die Tupferproben wurden über Nacht bei 4°C gelagert und am nächsten Tag ohne vorheriges Filtrieren auf die TH-1-Zellkulturen verimpft. Die enthaltenen Antiinfektiva waren jedoch nicht in der Lage, die Vermehrung der Bakterien und Pilze zu hemmen. Dadurch war es nicht möglich, eine Aussage über das Vorhandensein von Viren zu treffen.

---

Als zweiter Ansatz wurden alle in der PCR positiven Tupferproben der Schildkröten „Gertrude“, CU60/09, „Agatha“ und „Klaus“ durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,45 µm filtriert und anschließend auf TH-1-Zellkulturen verbracht. Wie aus Punkt 4.3 ersichtlich ist, vermindert die Filtration durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,45 µm den Virusgehalt nicht so stark wie durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,2 µm. Jedoch tritt auch bei der Filtration durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,45 µm eine Reduktion der Virusmenge auf. Fünf der insgesamt 38 auf diese Weise untersuchten Tupferproben waren aufgrund von Bakterienvermehrung oder Pilzwachstum nicht auswertbar (Hornstück von „Gertrude“ vom 24.10.2009, Hauttupferprobe von „Gertrude“ vom 4.11.2009, Hauttupferprobe von der Plastronverletzung von „Gertrude“ vom 16.11.2009, Rachentupferprobe von CU60/09 vom 18.11.2008 und Rachentupferprobe von „Agatha“ vom 22.6.2009). In zwei Tupferproben ließ sich Ranavirus mittels TH-1-Zellkultur isolieren. In der Rachentupferprobe von „Gertrude“ vom 18.11.2008 ließ sich in der vierten Passage Ranavirus nachweisen. Die Rachentupferprobe von *Testudo marginata* CU60/09 zeigte in der dritten Passage einen Ranavirus-typischen cpE.

## 5 DISKUSSION

Bis zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit gab es keine Berichte aus Deutschland über Erkrankungen nach Infektion von Schildkröten mit Ranavirus. Die aus Europa stammenden Veröffentlichungen berichten von Erkrankungsfällen in der Schweiz und in Österreich (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; MARSCHANG et al., 1999; BENETKA et al., 2007). In meiner Arbeit wurde die Beteiligung von Ranaviren an schweren und häufig tödlichen Krankheitsgeschehen in mehreren Beständen in Deutschland nachgewiesen werden. Zusätzlich zu dem bereits häufiger gelungenen Virusnachweis in der Spezies *Testudo hermanni* (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; MARSCHANG et al., 1999) konnten Erkrankungen nach Infektion mit Ranavirus erstmalig bei *Testudo graeca* sowie *Testudo marginata* dokumentiert werden. Dank der vorliegenden Bestandsberichte und der eigenen erhaltenen Ergebnisse konnten verschiedene Verlaufsformen und Ausprägungen der Erkrankung erfasst werden und einige Hinweise auf die vermutliche Pathogenese gegeben werden (s. Punkt 5.6). In diesem Zusammenhang wurde erstmalig vom zeitgleichen Auftreten von Panzerschäden bei erkrankten Schildkröten berichtet (s. Punkt 3.12 und 4.12).

Zur Diagnose einer Ranavirusinfektion stehen mehrere Methoden zur Verfügung (s. Punkt 5.4). Histologisch können intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen einen Hinweis auf eine Ranavirusinfektion geben. Einschlusskörperchen waren jedoch nur bei einem Teil (27 %) der seziierten Schildkröten zu finden, so dass sie nur im positiven Fall beweisend für eine Ranavirusinfektion sind. Des Weiteren können die TH-1-Zellkultur und die Ranavirus-spezifische PCR zum Nachweis von Ranavirus eingesetzt werden. Beide Methoden wurden überprüft und optimiert. Dabei zeigte sich, dass die PCR sehr viel sensitiver als die Zellkultur ist. Der Unterschied zwischen beiden Testmethoden ist hoch signifikant ( $p < 0,001$ ).

Da bis zum Zeitpunkt meiner Arbeit in Europa kein Verfahren zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern bei Schildkröten zur Verfügung stand, wurde von mir ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gesucht. Es zeigte sich, dass mittels eines klassischen Neutralisationstests keine neutralisierenden

Antikörper im Serum nachweisbar sind (s. Punkt 5.3.1). Von mir wurde ein ELISA etabliert und auf Spezifität und Sensitivität überprüft (s. Punkt 5.3.2). Mit Hilfe dieses ELISA wurden 227 Seren von erkrankten, genesenen und unverdächtigen Schildkröten auf Ranavirus-spezifische Antikörper untersucht. Zum Antikörpernachweis wurde Blut aus dem subcarapazialen Sinus (HERNANDEZ-DIVERS, 2006) entnommen und daraus Serum gewonnen. Zum Einsatz in den ELISA werden nur 20 µl Serum benötigt, so dass es nicht nötig ist, eine große Menge Blut zu gewinnen und diese Methode somit auch für kleine Schildkröten geeignet ist.

Es wurden erstmalig längerdauernde Untersuchungen (bis zu zwei Jahren) zur Virusausscheidung (s. Punkt 5.4) und dem Verlauf der Antikörpertiter (s. Punkt 5.3.2.1) durchgeführt. Mit dem erhaltenen Wissen über die Möglichkeit einer länger andauernden Virusausscheidung und über die Sensitivität der verschiedenen Methoden zum Virusnachweis sowie mit der nun vorhandenen Möglichkeit zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern, können Erkrankungsfälle schneller erkannt und von ähnlich verlaufenden Krankheiten anderer Ätiologie (z. B. Schildkröten-Herpesvirus) abgegrenzt werden sowie vormalig erkrankte und inzwischen genesene Schildkröten festgestellt werden, was hoffentlich einer weitere Ausbreitung der Ranavirusinfektion entgegen wirkt (s. Punkt 5.7).

Acht Virusisolate aus Schildkröten sowie zwei Ranavirusisolate aus Amphibien wurden auf ihre Filtrationseigenschaften (s. Punkt 5.1) sowie auf ihre Vermehrungsfähigkeit in Abhängigkeit von der verwendeten Zellkultur und der Inkubationstemperatur (s. Punkt 5.2) untersucht. Aufgrund dieser Untersuchungen konnten Rückschlüsse auf den Einfluss der Umgebungstemperatur auf den Krankheitsverlauf gezogen werden (s. Punkt 5.2.1).

Mittels Restriktionsenzym- und Sequenzanalyse konnten die verwandtschaftlichen Beziehungen dieser acht deutschen Ranavirusisolate aus Schildkröten untereinander und zu anderen Ranavirusisolaten bestimmt werden (s. Punkt 5.5). Die acht Ranavirusisolate von Schildkröten waren aus sieben verschiedenen Beständen ausgewählt worden, um eine repräsentative Stichprobe für die in Deutschland bei europäischen Landschildkröten bis zum jetzigen Zeitpunkt

aufgetretenen Erkrankungen zu erhalten. Dennoch können die verwendeten Virusisolate nicht repräsentativ für alle bei Schildkröten aufgetretenen Erkrankungen nach Ranavirusinfektionen sein. In anderen Ländern, bei anderen Schildkrötenarten und bei zukünftigen Erkrankungen in Deutschland könnten divergierende Ranaviren auftreten. Die untersuchten Ranavirusisolate zeigten sich sehr nahe verwandt, so dass man von einem Stamm sprechen kann. Von den anderen bisher sequenzierten Ranaviren, darunter auch Schildkrötenranaviren, unterscheiden sich die deutschen Isolate jedoch (s. Punkt 5.5).

### 5.1 Filtrationseigenschaften von Ranaviren

Membranfiltrationen und anschließende Titrationsen der Filtrate wurden in TH-1-Monolayern durchgeführt. Der Virustiter war nach Filtration durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,45 \mu\text{m}$  um ca. eine Zehnerpotenz und durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,2 \mu\text{m}$  um ca. zwei Zehnerpotenzen vermindert. Von MARSCHANG et al. (1998) wurde eine Reduktion des Virustiters eines Ranavirus aus einer *Testudo hermanni* um zwei Zehnerpotenzen nach einer Filtration durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,45 \mu\text{m}$  genannt, während kein Viruspartikel einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,2 \mu\text{m}$  passierte. In der genannten Publikation fehlen Angaben zur Höhe des Virustiters vor der Filtration. Deshalb ist nicht zu erkennen, ob der nicht gelungene Nachweis von Virus nach der Filtration durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,2 \mu\text{m}$  auf einen zu niedrigen Anfangstiter zurückzuführen ist.

Ranaviren kommen sowohl als unbehüllte als auch als behüllte Viruspartikel vor, die beide infektiös sind. Unbehüllte Viruspartikel weisen eine Größe von  $150 \text{ nm}$  auf, während behüllte Viruspartikel  $160\text{-}200 \text{ nm}$  groß sind (CHINCHAR et al., 2005). Eventuell können nur die kleineren unbehüllten Viruspartikel einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,2 \mu\text{m}$  passieren, so dass es je nach Vorhandensein einer Virushülle zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen kann. Einen Filter mit einer mittleren Porenweite von  $0,45 \mu\text{m}$  müssten alle Ranaviren unabhängig von ihrer eventuell vorhandenen Hülle ungehindert passieren können. MARSCHANG (persönliche Mitteilung) berichtet jedoch, dass Ranavi-

ren leicht untereinander sowie mit in der Suspension vorhandenen Schwebstoffen Aggregate bilden können. Dadurch erscheint es möglich, dass sie selbst von einem Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,45 µm zurückgehalten werden können.

## 5.2 Virusvermehrung in verschiedenen Zellkulturen bei 28 °C und 37 °C

Alle zehn untersuchten Virusisolate vermehrten sich unter Bildung eines cpE in verschiedenen Reptilien- und Säugetierzelllinien bei 28 °C. Dagegen konnte bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C keine Virusvermehrung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse entsprechen denen von CHEN et al. (1999), MARSCHANG et al. (1999) und HYATT et al. (2002), in deren Untersuchungen zwei Schildkröten- und ein Schlangenranavirus ebenfalls bei 37 °C keine Vermehrung zeigten. Im Gegensatz dazu vermehrte sich ein Ranavirus aus einem Gecko (*Uroplatus fimbriatus*) sowohl bei 28 °C als auch bei 37 °C. Die höheren Virustiter konnten jedoch nach einer Inkubation bei 28 °C gemessen werden (MARSCHANG et al., 2005).

Mit Ausnahme des Isolats von MARSCHANG et al. (2005) konnten sich alle untersuchten Ranaviren aus Reptilien nicht bei 37 °C vermehren. Dieses bietet eine Erklärung, warum Ranavirus bisher nur ektotherme Vertebraten (Amphibien, Fische und Reptilien) und nicht endotherme Vertebraten (Vögel und Säugetiere) infiziert. Die Temperatur scheint der einzige Grund zu sein, da in Säugetier- und Vogelzellen, solange diese bei Temperaturen bis maximal 30 °C inkubiert wurden, die Vermehrung von Ranavirus gelang (s.u.).

In den Arbeiten von CHEN et al. (1999), MARSCHANG et al. (1999) und HYATT et al. (2002) konnte gezeigt werden, dass sich die dort untersuchten Ranavirusisolate in verschiedenen Reptilien- (GL-1, TH-1 und VH2), Vogel- (CEF, CELC und CK), Fisch- (BF-2, CHSE, CO, EPC und FHM) und Säugetierzellen (BHK-21, MDBK, PK(15) und Vero) bei Temperaturen zwischen 15 °C und 30 °C vermehrten. Das Temperaturoptimum lag bei 25 °C bis 30 °C (CHEN et al., 1999). Die Vermehrung gelang jedoch in einer Insektenzelllinie (SF-21) sowie in einigen Fischzelllinien (BF-2, CHSE, PG, R1 und RTG-2) nicht. Nicht alle Autoren kamen dabei zu demselben Ergebnis. HYATT et al. (2002) gelang die Vermeh-

rung eines Pythonranavirus nicht in der Fischzelllinie BF-2, während das Ranavirus aus einer *Trionyx sinensis* sich in BF-2-Zellen vermehrte (CHEN et al., 1999). Das schon bei der Untersuchung zur Temperaturpräferenz abweichend reagierende Gecko-Ranavirus ließ sich auch in Insektenzelllinien (High five™ und SF-21) vermehren, ohne in diesen Zellen jedoch einen cpE hervorzurufen (MARSCHANG et al., 2005). Diese Unterschiede sind möglicherweise in den genetisch unterschiedlichen Virusisolaten verankert oder auf unterschiedliche Anzuchtbedingungen (z. B. verwendetes Medium, Dauer der Passagen bzw. der Inkubation) der Zelllinien und eine daraus folgende unterschiedlich gute Zellvermehrung zurückzuführen.

Während meiner Arbeit konnte bei einer Inkubation bei 28 °C in den Zelllinien BGM, SFT und Na kein cpE beobachtet werden. Bei der anschließenden Titerbestimmung der in SFT- und Na-Zellkulturen vermehrten Viren konnten nur sehr geringe Virustiter festgestellt werden. Die Titer der in BGM-Zellen angezüchteten Viren waren etwas höher als die Titer nach Vermehrung in SFT- und Na-Zellen. Die Zelllinie BGM vermehrte sich bei 28 °C nicht. Weil kein konfluenter Monolayer ausgebildet wurde, konnte ein cpE nicht festgestellt werden. Die Höhe der Virustiter war durch die schlechte Zellvermehrung zwar vermindert, zeigte jedoch eine Vermehrung der Viren an. Die Zelllinien SFT und Na zeigten bei einer Inkubation bei 28 °C ein schlechtes Wachstum. Dass diese beiden Zelllinien trotz ihrer im Gegensatz zu der Zelllinie BGM vorhandenen Zellvermehrung niedrigere Virustiter als diese Zelllinie aufwiesen, deutet darauf hin, dass SFT- und Na-Zellen sich nicht für die Vermehrung von Ranaviren eignen. Ob die Ranavirusisolate diese beiden Zellarten (Thymus- und Neuroblastomzellen) nicht infizieren können und aus welchen Gründen dies nicht gelang, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht klären.

Die höchsten Virustiter konnten in der eigenen Arbeit nach einer Vermehrung in TH-1-Zellen gemessen werden. Im Gegensatz dazu waren die von MARSCHANG et al. (1999) bestimmten Virustiter in Vogel- und Säugetierzelllinien mehr als hundertfach höher als in TH-1-Zellen. Eine besondere Spezifität für TH-1-Zellen wurde möglicherweise bei den von mir verwendeten Isolaten durch einige vorhergehende Passagen auf TH-1-Zellen zum Aufreinigen der Isolate selektiert.



Auch unterschiedliche Eigenschaften der Virusisolate oder ein besseres Wachstum der Säugetierzelllinien bei der von MARSCHANG et al. (1999) durchgeführten Untersuchung können eine Erklärung für die unterschiedlichen Virustiter sein. Trotz dieser eventuell stärkeren Vermehrung auf Vogel- oder Säugetierzellen, eignet sich die Reptilienzelllinie TH-1 besser zum Nachweis von Ranaviren. Vogel- und Säugetierzellen bevorzugen höhere Inkubationstemperaturen. Daher lassen sie sich bei 28 °C, dem Temperaturoptimum der Ranaviren, nur schlecht vermehren und zeigen häufig Veränderungen der Zellmorphologie, die eine sichere Diagnose eines cpE erschweren können. Außerdem lassen sich bei einer Inkubation in TH-1-Zellen auch andere eventuell vorhandene Schildkrötenviren (Herpesvirus, Virus X) isolieren, was gerade bei unklarer Ätiologie als Vorteil anzusehen ist.

Obwohl nach einer Inkubation bei 37 °C keine Virusvermehrung mit Hilfe der Bestimmung des Virustiters und Kontrolle der Virusgenommenge durch die PCR nachgewiesen werden konnte, wurden in einigen Säugetierzelllinien (BGM, BHK, KOP, SFT und Na) bei einer Inkubation bei 37 °C zytopathische Effekte erkannt. Diese Effekte konnten vor allem bei Viren (5187/07, 5810/07, 6172/07, 354/08 und CU10/08) mit einer etwas höheren Anfangs-KID<sub>50</sub> beobachtet werden. Laut CHINCHAR (2002) vermehrt sich FV-3 nur bei Temperaturen zwischen 12 °C und 32 °C. Bei Temperaturen oberhalb von 32 °C werden zwar einige virusspezifische Makromoleküle synthetisiert, es kommt jedoch nicht zur Entstehung von infektiösen Virionen. Es konnte gezeigt werden, dass bei 37 °C die immediate early Transkription stattfindet, während die delayed early und die late Transkription gehemmt sind.

In einigen Versuchen wurde Mäusen oder Ratten das Virus FV-3 intravenös oder intraperitoneal inokuliert, woraufhin diese Tiere eine akute degenerative Hepatitis entwickelten (BINGEN et al., 1982; ESSBAUER und AHNE, 2001). Dasselbe Krankheitsbild entstand auch, wenn inaktiviertes Virus oder dessen lösliche Proteine verwendet wurden (ESSBAUER und AHNE, 2001). Da sich FV-3 bei 37 °C nicht vermehren kann, scheint die beobachtete Hepatitis auf einem toxischen Effekt zu beruhen. BINGEN et al. (1982) untersuchten die geschädigten,

parenchymalen Leberzellen und fanden nur virales Protein, jedoch keine virale DNA in den Zellen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse scheinen auch die in meinen Versuchen sichtbaren zytopathischen Veränderungen durch toxische Effekte und nicht durch Virusvermehrung hervorgerufen zu sein. Wird ein cpE durch Virusvermehrung hervorgerufen, so wird die Ausprägung des cpE durch eine zweite Passage und somit folgende weitere Virusvermehrung verstärkt und ausgeweitet. Wird ein cpE durch ein Toxin, in diesem Fall die nicht vermehrungsfähigen Viren, hervorgerufen, so ist der cpE in der zweiten Passage nur in abgeschwächter Form oder gar nicht mehr erkennbar, weil das Toxin durch die weitere Passage durch das Hinzufügen von neuen Zellen und neuem Medium verdünnt wird. Dass sich bei meinen Versuchen eine Abschwächung des cpE in der zweiten Passage beobachten ließ, bestätigt die Vermutung, dass der cpE durch toxische Effekte hervorgerufen wurde.

Es stellte sich die Frage, warum nur nach Verimpfung der Viren 5187/07, 6172/07 und CU10/08 und in einem Fall der Viren 5810/07 und 354/08 zytopathische Effekte zu beobachten waren. Eventuell sind diese Unterschiede in einer unterschiedlichen Zytotoxizität der Viren begründet. Durch die Restriktionsenzym- und Sequenzanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich um sehr nah verwandte bzw. mit der verwendeten Methodik nicht unterscheidbare Viren handelt, so dass keine großen Unterschiede in der Toxizität zu erwarten sind. Wahrscheinlicher ist, dass dieses Phänomen auf die leicht unterschiedlichen Anfangsvirustiter zurückzuführen ist. Die Viren, die zytopathische Effekte verursachten, waren mit einem etwas höheren Anfangsvirustiter eingesetzt worden. Anscheinend ist eine bestimmte Virusmenge nötig, um einen toxischen Effekt auszulösen. Dabei scheint eine Art Schwellenwert vorzuliegen, bis zu dem kein toxischer Effekt auftritt, da zwischen einer unveränderten Zellkultur und dem Auftreten eines großflächigen cpE nur geringe Unterschiede in der Höhe der Virustiter vorhanden waren.

Die Viren 5187/07, 5810/07, 6172/07, 354/08 und CU10/08 verursachten jedoch keine zytopathischen Effekte in den Zelllinien TH-1, VH2 und MDBK bei einer Inkubation bei 37 °C. Die beiden Reptilienzelllinien TH-1 und VH2 zeigten bei

suboptimaler Temperatur eine verschlechterte bzw. gar keine Vermehrung. Aufgrund dieses schlechten Zellwachstums waren vermutlich keine zytopathischen Effekte zu erkennen. Das Fehlen zytopathischer Effekte in der Zelllinie MDBK könnte auf einer zellspezifisch höheren Resistenz gegen den toxischen Effekt begründet sein.

### 5.2.1 Einfluss der Umgebungstemperatur auf den Krankheitsverlauf

Die Umgebungstemperatur scheint auch in vivo entscheidend für die Virusreplikation und die Entwicklung von Krankheitssymptomen zu sein. WHITTINGTON und REDDACLIFF (1995) untersuchten den Einfluss der Temperatur auf den Krankheitsverlauf nach einer Infektion von Flussbarschen (*Perca fluviatilis*) und Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV), einem Fischranavirus. Sie stellten fest, dass bei höheren Temperaturen (19 °C bis 21 °C) eine nur kurze Inkubationszeit auftrat, während sich bei niedrigeren Temperaturen die Inkubationszeit verlängerte bzw. keine Erkrankungen auftraten.

ROJAS et al. (2005) untersuchten den Einfluss der Temperatur auf den Infektionsverlauf mit *Ambystoma tigrinum* virus bei Tiger-Salamandern (*Ambystoma tigrinum*). Bei 26 °C überlebten die meisten Salamander die Infektion, während bei 18 °C alle und bei 10 °C fast alle Salamander starben. Bei 10 °C war zudem eine signifikant längere Inkubationszeit als bei 18 °C oder 26 °C feststellbar. ROJAS et al. vermuteten, dass bei 10 °C aufgrund der temperaturabhängigen Vermehrungsrate der Ranaviren nur eine langsame Virusreplikation auftritt, welche die etwas niedrigere Mortalität und die längere Inkubationszeit erklärt. Obwohl Ranaviren sich bei 26 °C stark vermehren, scheint das temperaturabhängige Immunsystem der Salamander bei dieser Temperatur die Virusreplikation verhindern zu können.

Aufgrund dieser Untersuchungsergebnisse erscheint es auch bei erkrankten Schildkröten sinnvoll, auf eine optimale Umgebungstemperatur zu achten. Laut den Mindestanforderungen an die Haltung von Reptilien vom BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ (Referat Tierchutz, 10.1.1997) sollten europäische Landschildkröten bei einer Umgebungs-

temperatur von 23 °C bis 26 °C mit einer Strahlungswärme von 45 °C gehalten werden. Die Körpertemperatur der Schildkröten liegt um 0,1 °C bis 0,2 °C unter der Umgebungstemperatur (HUNT, 1964). *Testudo hermanni* und *Testudo marginata* erreichen Körpertemperaturen bis zu 35 °C. Steigt ihre Körpertemperatur weiter an, so suchen Tiere beider Arten Schatten auf (PANAGIONTA und VALAKOS, 1992). Es erscheint sinnvoll, den Schildkröten zu ermöglichen, ihre Körpertemperatur auf über 32 °C zu erhöhen, da sich vorhandene Ranaviren so vermutlich nicht vermehren können. Des Weiteren hat eine optimale Umgebungstemperatur einen positiven Einfluss auf das Immunsystem, da die Leistungsfähigkeit des Immunsystems von Reptilien temperaturabhängig ist (COOPER et al., 1985; ORIGGI, 2007).

Bei einigen an den Folgen einer Infektion mit Ranavirus erkrankten Schildkröten ließ sich beobachten, dass diese vermehrt sonnenbadeten (JOHNSON et al., 2007; eigene Beobachtungen). Es stellt sich die Frage, ob die Schildkröten „spüren“, dass eine Temperaturerhöhung hilfreich für die Heilung ist und sie sich daher freiwillig einer Art „Fieber“ aussetzen.

### 5.3 Antikörpernachweise

#### 5.3.1 Neutralisationstest

Es ließen sich keine neutralisierenden Antikörper mittels klassischer Neutralisationstests nachweisen, wie es beispielsweise bei der Herpesvirusinfektion der Landschildkröten möglich ist. Auch Modifikationen der Testansätze (Verlängerung der Virussuspension-Serum-Inkubationszeit, Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen) brachten keinen Erfolg.

Dieses Resultat entspricht den Beobachtungen bei Amphibien und Fischen. ZUPANOVIC et al. (1998a) teilten mit, dass polyklonale Antikörper gegen Ranavirus von Amphibien keine signifikante neutralisierende Aktivität aufweisen. Auch ESSBAUER und AHNE (2001) geben an, dass durch EHNV, ein Ranavirus der Echten Knochenfische (*Teleostei*), keine neutralisierenden Antikörper gebildet werden.

Die von CHINCHAR et al. (1984) entwickelten monoklonalen Maus-Antikörper gegen verschiedene Epitope des FV-3 zeigten erst nach Zugabe eines sekundären Antikörpers (Kaninchen-anti-Maus-Antikörper) eine signifikante Reduktion der Virusinfektiosität. Aufgrund dieser Angabe wurde einem Teil der untersuchten Schildkrötenseren ein Maus-anti-Schildkröten-Antikörper hinzugefügt. Jedoch auch dadurch konnte kein neutralisierender Effekt beobachtet werden. Ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte sein, dass Ranaviren sich in Mäusen mit einer konstanten Körpertemperatur von 37 °C nicht vermehren können (s. Punkt 5.2), was eventuell in der Bildung einer anderen Klasse von Antikörpern resultiert. Möglicherweise sind diese Unterschiede auch durch den sekundären Antikörper bedingt. CHINCHAR et al. (1984) setzten einen Kaninchen-anti-Maus-Antikörper ein, wohingegen in meiner Arbeit ein Maus-anti-Schildkröten-Antikörper eingesetzt wurde. CHINCHAR et al. (1984) gebrauchten den Antikörper in einer Verdünnung von 1:10. In der eigenen Arbeit wurden 10 µl des sekundären Antikörpers in unverdünnter Form (5,31 mg/ml) verwendet. Aufgrund fehlender weiterer Angaben zur Menge des eingesetzten sekundären Antikörpers in der Arbeit von CHINCHAR et al. (1984) lässt sich die Antikörpermenge nicht vergleichen. Eventuell wurde in der eigenen Arbeit eine zu geringe Menge des sekundären Antikörpers eingesetzt.

Somit konnte auch von CHINCHAR et al. (1984) keine neutralisierende Aktivität der entwickelten Antikörper gegen FV-3 nachgewiesen werden. Da nur in Verbindung mit dem sekundären Antikörper eine neutralisierende Aktivität gezeigt werden konnte, scheint der sekundäre Antikörper für die Neutralisation des Virus ursächlich zu sein.

Der zusätzlich nach den Angaben von MANIERO et al. (2006) durchgeführte modifizierte Neutralisationstest konnte ebenfalls keine neutralisierende Aktivität der Antikörper nachweisen. MANIERO et al. (2006) konnten zeigen, dass die nach experimenteller Infektion von *Xenopus laevis* mit FV-3 gewonnenen Antikörper mit dem Virus FV-3 gelatinöse Immunopräzipitate bilden, zu einem gewissen Grad zytopathische Effekte verhindern und den Virustiter vermindern können. Diese Beobachtung konnte mit eigenen Untersuchungen nicht bestätigt werden. Das mag in der Tatsache begründet sein, dass es sich um zwei verschiedene

Tierklassen (Amphibien und Reptilien) und somit unterschiedliche Immunsysteme handelt. Eventuell bestehen auch Unterschiede zwischen der Bildung von Antikörpern nach einer natürlichen und einer künstlichen Infektion. In der Arbeit von MANIERO et al. (2006) wurden die Frösche durch intraperitoneale Injektion von Virusmaterial infiziert. Möglicherweise wiesen die Frösche daher viel höhere Antikörpertiter auf als die von mir untersuchten Schildkröten.

MAINERO et al. (2006) konnten nur eine schwache neutralisierende Aktivität nachweisen, die nicht in der Lage war, bei einem unverdünnten Einsatz die Ausbildung eines cpE in der Zellkultur vollständig zu verhindern. Nach der in der eigenen Arbeit durchgeführten Virus-Serum-Inkubation konnten zum Teil sogar erhöhte Virustiter gemessen werden. Dieses lässt sich dadurch erklären, dass sich im Serum enthaltene Proteine förderlich auf die Vermehrung der Viren ausgewirkt haben.

Normalerweise sind neutralisierende Antikörper (z. B. Antikörper von Schildkröten gegen Herpesvirus oder Antikörper von Schweinen gegen Klassische Schweinepest) in der Lage selbst in verdünnter Form die Ausbildung eines cpE in der Zellkultur vollständig zu verhindern. Ein Neutralisationstest scheint daher, selbst wenn eine schwache neutralisierende Aktivität der Ranavirus-spezifischen Antikörper von Schildkröten bestätigt werden könnte, keine besonders geeignete Nachweismethode für Ranavirus-spezifische Antikörper zu sein, da ein geringer Antikörpertiter bei einer nur schwach neutralisierenden Aktivität im Neutralisationstest nicht nachweisbar ist.

Es ist nicht klar, ob die Ranavirus-spezifischen Antikörper zur Viruseliminierung beitragen. Die Tatsache, dass im ELISA nachgewiesene Antikörper keine neutralisierende Aktivität in der TH-1-Zellkultur aufweisen, sagt nicht aus, dass die Antikörper auch in vivo keine neutralisierende Aktivität besitzen können. Die Antikörper leisten möglicherweise auch durch Opsonierung und damit besserer Bekämpfung durch Phagozyten oder über eine Aktivierung des Komplementsystems einen Beitrag zur Virusabwehr.

### 5.3.2 ELISA

Angelehnt an die Methode von JOHNSON et al. (2007), konnte ein eigener ELISA zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern entwickelt werden. Dieser ELISA stellt eine zuverlässige Methode zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern dar, weil durch die guten Ergebnisse der Qualitätsparameter Intra-Assay-Präzision, Inter-Assay-Präzision und Verdünnungsexzessivität eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gesichert ist. Eine hohe Spezifität ist gegeben, da keine Kreuzreaktionen mit Antikörpern gegen Schildkröten-Herpessviren nachgewiesen werden konnten und bei allen Schildkröten, bei denen keine Erkrankung durch Ranaviren bekannt war, keine Antikörper nachgewiesen werden konnten. Die Sensitivität dieses ELISA scheint ebenfalls hoch zu sein, weil bei allen Schildkröten, die an den Folgen einer Ranavirusinfektion erkrankt und genesen waren, Antikörper nachgewiesen werden konnten. Da dieser ELISA zurzeit die einzige Methode zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern ist und somit kein Goldstandard existiert, besteht nicht die Möglichkeit, die Spezifität und Sensitivität dieses ELISA mit einem anderen Testverfahren zu vergleichen.

Um antigenetische Unterschiede zwischen Ranaviren festzustellen, wurden zwei verschiedene Isolate als Antigen im ELISA eingesetzt. Es konnten keine Unterschiede in der Antikörperreaktion festgestellt werden. Es waren zwei Virusisolate möglichst unterschiedlicher Herkunft zur Überprüfung einer antigenetischen Divergenz ausgewählt worden. Isolat CU60/09 wurde 2009 aus einer *Testudo marginata* aus Bestand E isoliert, aus dem viele der untersuchten Seren stammten. Isolat 882/96 war 1996 aus einer *Testudo kleinmanni* isoliert worden und hatte in der Restriktionsenzymanalyse die meisten von den anderen Schildkrötenisolaten abweichenden Banden gezeigt. Nach den Ausführungen in Punkt 5.5 sind die Unterschiede in der Restriktionsenzymanalyse jedoch so gering, dass beide Isolate als sehr nahe verwandt zu bezeichnen sind.

Es wäre interessant zu untersuchen, ob antigenetische Unterschiede zu weniger nah verwandten Schildkrötenranaviren (z. B. Isolaten aus den USA) vorhanden sind. Da bisher alle in Deutschland untersuchten Ranavirusisolate sehr nah verwandt bzw. nicht unterscheidbar von den beiden als Antigen eingesetzt-

ten Viren sind (s. Punkt 5.5), ist es wahrscheinlich, dass bei Schildkröten aus Deutschland gegebenenfalls vorhandene Antikörper gegen Ranavirus keine antigenetische Divergenz aufweisen und sich daher alle im ELISA nachweisen lassen. Eine gewisse Vorsicht bei der Interpretation der Ergebnisse ist jedoch angebracht, da jederzeit durch Importe möglicherweise antigenetisch divergierende Ranaviren eingeschleppt werden können.

Zur Bestimmung des Proteingehalts der Virussuspension wurde anfänglich die Proteinbestimmungsmethode nach BRADFORD (1976) verwendet. Die Bestimmung des Standardproteins (BSA) ergab die erwarteten Messwerte, aber die Virussuspension erzielte nur geringgradig höhere Extinktionen als die Kontroll-suspension. Wurde die Proteinmenge ohne Zugabe von Reagenzien (Farbindikatoren) photometrisch bestimmt, so ergaben sich höhere Proteingehalte. Verunreinigungen oder die Heterogenität der Proteine in der Virussuspension scheinen die Ausbildung der Farbentwicklung zu vermindern.

Vor dem Blocken der ELISA-Platten wurde aufgrund besserer Ergebnisse auf den Einsatz von Tween verzichtet. Detergenzien wie Tween können durch instabile Haftung vorübergehend an die Plattenoberfläche binden. Die so besetzten Bereiche können vom Magermilchpuffer nicht blockiert werden, was in der Folge zu erhöhten unspezifischen Bindungen führen kann (NUNC<sup>TM</sup>, 2001).

Der in meiner Arbeit verwendete sekundäre Antikörper HL1546 bindet nur an Antikörper aus wenigen Schildkrötenspezies. HL1546 bindet Antikörper der Spezies *Testudo hermanni*, *Testudo graeca*, *Testudo horsfieldii* (ORIGGI et al., 2001), *Testudo kleinmanni* und *Indotestudo elongata* (BROWN, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund konnten die verfügbaren Seren von *Testudo marginata*, *Terrapene carolina* sowie *Geochelone sulcata* nicht auf das Vorhandensein von Antikörpern untersucht werden. Ein kompetitiver ELISA würde dieses Problem lösen können, weil dann alle Seren unabhängig von der Schildkrötenspezies untersuchbar sind. Die dafür nötige große Menge eines Antikörpers gegen Ranavirus mit bekannter Konzentration war nicht gegeben.

In der eigenen Arbeit konnte nur eine sehr geringe Probenanzahl aufgrund der Speziespezifität des sekundären Antikörpers nicht untersucht werden. Für künftige Untersuchungen mag es, je nach den zu untersuchenden Schildkrö-



tenspezies, nötig sein, einen anderen sekundären Antikörper zu verwenden oder beim Vorliegen von Proben von sehr vielen verschiedenen Spezies, einen kompetitiven ELISA zu entwickeln.

In der Arbeit von JOHNSON et al. (2007) wurde ein Cut-off-Wert von 2 bei einer Verdünnung der Blutplasmaproben von 1:100 festgelegt. In der eigenen Arbeit wurde ein Cut-off-Wert von 1,54 errechnet. Es wurden zwei Serumverdünnungen (1:10 und 1:100) verwendet. Ergab das Serum nur in der Verdünnung 1:10 einen Wert oberhalb von 1,54, so wurde es als fraglich bezeichnet. Die Verwendung von zwei Serumverdünnungen bietet den Vorteil, dass, wenn die gemessenen Extinktionen nicht zu dem Verhältnis der eingesetzten Verdünnungsstufen passen, eine unspezifische Erhöhung der Extinktion leichter als diese erkannt werden kann. Zudem lassen sich in der geringeren Verdünnungsstufe auch niedrige Antikörpertiter nachweisen, während hohe Antikörpertiter, die in der geringeren Verdünnung sehr hohe, nicht mehr auswertbare Extinktionen liefern, in der stärkeren Verdünnungsstufe auswertbar bleiben. Diesen Vorteilen stehen als Nachteile der etwas höhere Material- und Zeitaufwand entgegen.

In der Publikation von JOHNSON et al. (2007) ist nicht angegeben, mit welcher Begründung ein Cut-off-Wert von 2 gewählt wurde. Es wird nur auf einen anderen ELISA (Antikörper von *Alligator mississippiensis* gegen das West-Nil-Virus, JACOBSON et al., 2005) verwiesen, bei dem derselbe Cut-off-Wert genannt wurde. Der Cut-off-Wert meines ELISA wurde mit Hilfe einiger Negativkontrollen bestimmt und ist somit genau auf diesen Assay zugeschnitten. In der Veröffentlichung von JOHNSON et al. (2007) existiert keine Angabe zu der im Test eingesetzten Virusproteinmenge. Es ist nur angegeben, dass eine 1:400 Verdünnung verwendet wurde. Bei der Durchführung meines ELISA wurden im Vergleich zum ELISA von JOHNSON et al. (2007) einige Arbeitsschritte aufgrund der besseren Durchführbarkeit und der besseren Ergebnisse verändert. Daher ist davon auszugehen, dass die von mir untersuchten Seren bei einem Einsatz in den ELISA von JOHNSON et al. (2007) geringfügig andere Ergebnisse liefern würden. Um miteinander vergleichbare Ergebnisse aus verschiedenen Laboren zu erhalten, müssten standardisierte Testbedingungen, wie z. B. identische Durchfüh-

rung und gleiche ELISA-Komponenten (verwendetes Virus, Positiv- und Negativkontrollen), geschaffen werden.

Bei einer Verwendung eines Cut-off-Wertes von 2 ergäben die fünf Seren mit fraglichem Ergebnis sowie eine als positiv gewertete Probe (E2.1) ein negatives Ergebnis. Bei Verwendung des in der eigenen Arbeit eingesetzten Cut-off-Werts von 1,54 ergaben nur Seren von Schildkröten, die an Ranavirus erkrankt waren, positive Ergebnisse, während alle Schildkröten ohne bekannte Erkrankung durch Ranavirus negative Ergebnisse lieferten. Dieses spricht gegen die These, dass durch Herabsetzen des Cut-off-Werts falsch positive Ergebnisse entstehen. Meines Erachtens nach sind für den praktischen Einsatz dieses Antikörpernachweisverfahrens falsch positive Ergebnisse besser zu werten als falsch negative. Im Fall eines positiven Testergebnisses sollte die betreffende Schildkröte von den anderen getrennt werden, um eine Ansteckung zu verhindern. Unterstützende Therapiemaßnahmen sind jedoch ohne das Vorliegen von Krankheitssymptomen nicht sinnvoll. Folglich entsteht für die betreffende Schildkröte kein Schaden. Wird jedoch eine Schildkröte mit Ranavirus-spezifischen Antikörpern nicht erkannt, besteht die Gefahr, dass der gesamte Bestand über eine eventuelle Virusausscheidung infiziert wird und eine hohe Mortalität auftritt.

Der Nutzen des fraglichen Bereichs ist strittig. Bei Betrachtung der vier Schildkröten, deren Seren fragliche Ergebnisse ergaben, lassen sich je nach Spezies unterschiedliche Konsequenzen ableiten. Die beiden *Testudo hermanni* zeigten bei einer späteren Probennahme einen nachweisbaren Gehalt an Antikörpern. Bei beiden *Testudo hermanni* wurde eine vorhergehende Erkrankung berichtet. Die beiden *Testudo graeca* mit fraglichen Ergebnissen stammen aus einem Bestand in dem Erkrankungen durch Ranavirus aufgetreten waren, jedoch aus Gehegen, in denen bisher keine Schildkröte Krankheitssymptome gezeigt hatte. Die Ergebnisse im fraglichen Bereich scheinen nur für *Testudo hermanni* ein Hinweis auf eine gerade stattfindene Serokonversion zu sein. Theoretisch denkbar ist, dass die beiden *Testudo graeca* irgendwann, bevor sie in die Bestände E und H kamen, eine Infektion mit Ranavirus überlebt und Antikörper

gebildet haben und die nun erhaltenen fraglichen Ergebnisse den verbliebenen Überrest der damals gebildeten Antikörper darstellen.

Der genutzte Cut-off-Wert wurde mit Hilfe von Seren aus *Testudo hermanni* festgelegt. Eventuell ergibt sich für jede Schildkrötenspezies ein anderer Spezies-spezifischer Cut-off-Wert. Die erhaltenen fraglichen Ergebnisse von fünf Seren stellen nur eine sehr geringe Anzahl dar, so dass es sinnvoll erscheint, weitere Untersuchungen über die Aussagekraft des fraglichen Bereichs vorzunehmen. Zum Zeitpunkt meiner Arbeit lagen jedoch nicht mehr Seren von an Ranavirus erkrankten Schildkröten aus Deutschland vor. Bis zum Vorliegen weiterer Untersuchungen sollte der fragliche Bereich beibehalten werden und die Schildkröten zumindest nach einer gewissen Zeit erneut untersucht werden.

Alle 16 positiven Seren stammten von *Testudo hermanni*. Dieses lässt keine Rückschlüsse auf eine Speziespezifität zu, da 80 % der untersuchten Seren von *Testudo hermanni* stammten und alle mit Hilfe des ELISA untersuchten, längerfristig genesenen Schildkröten zur Spezies *Testudo hermanni* gehören. Es lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen, ob andere europäische Landschildkröten in der Lage sind, ebenso wie *Testudo hermanni* Antikörper gegen Ranavirus zu bilden. In Bestand E existierte zwar eine genesene *Testudo marginata* (E3.37), bei der Antikörper gegen Ranavirus zu erwarten sind. Deren Serum ließ sich jedoch aufgrund der Speziespezifität des sekundären Antikörpers nicht auf das Vorhandensein von Antikörpern untersuchen. Ranavirusantikörper konnten bei einer *Geochelone platynota* (JOHNSON et al., 2007) und bei *Gopherus polyphemus* (JOHNSON und JACOBSON, 2008) nachgewiesen werden. BENETKA et al. (2007) berichten von einer genesenen *Geochelone pardalis pardalis*, bei der sich ebenfalls Antikörper vermuten lassen. Aufgrund der relativ seltenen Berichte über Ranavirusinfektionen und der hohen Mortalität lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen, ob bestimmte Schildkrötenspezies eine unterschiedlich große Überlebenschance haben.

Ebenso wie JOHNSON und JACOBSON (2008), die bei 15 von ca. 1.000 Seren von *Gopherus polyphemus* Antikörper nachweisen konnten, konnte in der eigenen Arbeit nur bei 16 von 227 untersuchten Seren Ranavirusantikörper nachgewiesen werden. Die höhere Nachweisrate in meiner Arbeit liegt darin begründet,

dass etwa die Hälfte der Seren aus Beständen mit Ranavirus-bedingten Erkrankungen stammte, während JOHNSON und JACOBSON (2008) freilebende Schildkröten ohne bekannte Vorgeschichte untersuchten. Bei keiner der über 100 untersuchten Seren aus Beständen ohne bekannte Erkrankungen durch Ranaviren ließen sich Antikörper gegen Ranavirus nachweisen. Dieses entspricht der Beobachtung, dass bisher nur in wenigen Beständen Erkrankungen durch Ranaviren aufgetreten sind.

### 5.3.2.1 Entwicklung und Verlauf der Antikörpertiter

Die erhaltenen 16 positiven Seren stellen nur eine geringe Anzahl an Proben dar. Jedoch ließen sich anhand dieser Proben erste Erwartungen über die Entwicklung und den Verlauf der Antikörpertiter formulieren. Da alle positiven Seren von *Testudo hermanni* stammten, beziehen sich die folgenden Aussagen nur auf die Entwicklung der Antikörpertiter bei *Testudo hermanni*. Ob andere Spezies ebenso und auf dieselbe Weise Ranavirusantikörper entwickeln, muss noch untersucht werden.

Ranavirus-spezifische Antikörper konnten nur bei Schildkröten nachgewiesen werden, die eine Erkrankung durch Ranavirus überlebt hatten und wieder genesen waren. Die Antikörper ließen sich erst eine gewisse Zeit nach Beginn der Erkrankung nachweisen. Der Zeitraum zwischen Erkrankungsbeginn und dem möglichen Nachweis von Antikörpern scheint zu variieren. „Agatha“ wies drei Monate nach Beginn der Erkrankung messbare Antikörperspiegel auf. Das Serum von „Fips“ ergab noch bei einer Untersuchung ein Jahr nach Beginn der Erkrankung einen fraglichen Wert. Erst bei der Untersuchung nach zwei Jahren konnten eindeutig positive Antikörpertiter nachgewiesen werden. Der Antikörpertiter schien auch nicht direkt mit dem Ende klinischer Symptome zu korrelieren. Während „Klaus“ zu dem Zeitpunkt, als er keine klinischen Symptome mehr zeigte, einen messbaren Antikörpertiter aufwies, ließ sich bei „Fips“, die acht Wochen nach Beginn der Erkrankung ein ungestörtes Allgemeinbefinden zeigte, erst nach zwei Jahren eindeutig Antikörper nachweisen.

Beginn der Bildung von Antikörpern und Höhe der Antikörpertiter scheinen vielmehr von der Schwere der Erkrankung abhängig zu sein. Die beiden Schild-

kröten „Minni“ und „Fips“ erkrankten zum annähernd selben Zeitpunkt. „Minni“ zeigte einen schweren Krankheitsverlauf mit Belägen in der Maulhöhle und Nasenausfluss. „Fips“ wies außer zögerlichem Fressen keine Symptome auf. Bei „Minni“ ließ sich zu beiden Probenahmezeitpunkten ein sehr viel höherer Antikörpertiter nachweisen. Selbst „Gertrude“, die ein Jahr nach „Fips“ erkrankt war und eine lang andauernde, schwere Erkrankung gezeigt hatte, wies Ende 2009 einen viel höheren Antikörpertiter auf als „Fips“ zum selben Zeitpunkt. Ein Erklärungsversuch für diese Beobachtung ist, dass möglicherweise eine hohe Virusdosis in den Schildkröten eine schwere Erkrankung und aufgrund der größeren Menge an Viruspartikeln eine stärkere Antikörperbildung hervorruft als eine niedrige Virusdosis, die nur eine leichte Erkrankung verursacht.

Die Antikörpertiter von allen mehrmalig untersuchten positiven Schildkröten stiegen im zeitlichen Verlauf an. Anhand der Proben von „Minni“ und „Fips“ ließ sich darlegen, dass zumindest bei einigen Schildkröten Antikörper über einen Zeitraum von mindestens zwei Jahren nachweisbar sind. Da die Antikörpertiter bis zu diesem Zeitpunkt weiter anstiegen, lässt sich vermuten, dass sich die Antikörper noch über einen längeren Zeitraum nachweisen lassen. Um dieses zu bestätigen, müssten längerfristige Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei könnte zusätzlich untersucht werden, ob Unterschiede in der Ausprägung des Antikörpertiters in Abhängigkeit von der Jahreszeit existieren. Bisher ergab sich kein Hinweis auf jahreszeitliche Schwankungen in der Höhe der Antikörpertiter.

Interessanterweise ließen sich bei Schildkröten aus den Beständen M und E, die in denselben Gehegen lebten wie erkrankte Schildkröten, aber selber keine Symptome aufwiesen, keine Antikörper nachweisen. Die Nichterkrankung dieser Schildkröten scheint also nicht durch schon vorhandene Antikörper bedingt zu sein. Entweder verhinderten andere Abwehrmechanismen, wie die unspezifische Immunabwehr (Phagozyten, Interferone, Komplementsystem etc.), bei diesen Schildkröten eine Infektion, oder es sind zusätzliche Faktoren (Stress, falsche Haltungsbedingungen, andere vorliegende Erkrankungen etc.) notwendig, um die Erkrankung auszulösen. Möglicherweise wurde auch durch die Art des Übertragungsweges ein Kontakt dieser Schildkröten mit dem Virus verhin-

dert. Über die Übertragung von Ranavirus von einer Schildkröte zu einer anderen ist bisher noch nichts bekannt. In dem Infektionsversuch von JOHNSON et al. (2007) entwickelten die Schildkröten nur nach intramuskulärer Injektion schwere Krankheitssymptome. Nach oraler Viruseingabe zeigten die Schildkröten nur eine kurzzeitige Anorexie. In ihrem Gewebe ließ sich im Gegensatz zu den i.m. infizierten Schildkröten kein Ranavirus nachweisen. Aufgrund dieser Angaben scheint eine orale Infektion bei Schildkröten eher unwahrscheinlich, obwohl diese Möglichkeit der Virusübertragung bei Amphibien nachgewiesen wurde (HARP und PETRANKA, 2006; BRUNNER et al. 2007). Die Notwendigkeit eines direkten Kontakts zur erfolgreichen Virusübertragung, eventuell über Wunden oder beim Decken, könnte erklären, warum nicht alle Schildkröten eines Geheges erkrankten.

Ob Antikörper die Schildkröten vor einer erneuten Erkrankung schützen können, ist noch fraglich. Schildkröte E2.1 wies einen niedrigen Antikörpertiter auf, erkrankte trotzdem nochmals und starb. Es ist nicht klar, ob die Antikörper generell keinen Schutz bieten oder ob in diesem Fall der Antikörpertiter noch nicht hoch genug war. Da bei allen genesenen Schildkröten Antikörper nachgewiesen wurden, haben die Antikörper vermutlich zur Heilung beitragen. Vorhandene Antikörper zeigen auf jeden Fall nicht an, dass kein Virus mehr ausgeschieden werden kann. Bei „Gertrude“ und „Klaus“ konnte trotz mittelhoher Antikörpertiter (12,69/4,88 bzw. 6,06/2,42) Ranavirusgenom in Rachtentupferproben nachgewiesen werden. Bei „Gertrude“ konnte sogar bei Vorliegen eines sehr hohen Antikörpertiters (29,00/14,35) Ranavirusgenom in einem vom Plastron abgelösten Hornstück sowie in Tupferproben vom betroffenen Gewebe nachgewiesen werden.

Bei neu zugekauften Schildkröten sollte zusätzlich zu der immer empfehlenswerten Quarantäne ein Nachweis auf Antikörper gegen Ranaviren durchgeführt werden, so wie bereits häufig ein Nachweis auf Antikörper gegen Herpesviren erfolgt. Zum jetzigen Zeitpunkt erscheint es wahrscheinlich, dass Schildkröten, die einmal an Ranavirus erkrankt waren und Antikörper gebildet haben, trotzdem Virus ausscheiden können. Bei Amphibien und Fischen konnte nachgewiesen werden, dass es zu klinisch gesunden Tieren kommen kann, die trotz-

dem Ranavirus ausscheiden (WHITTINGTON und REDDACLIFF, 1995; BRUNNER et al., 2004; ROJAS et al., 2005) Es ist jedoch nicht klar, ob es sich bei Ranaviren, ähnlich wie bei Herpesviren, um eine echte, lebenslange Viruspersistenz handelt oder um eine zeitlich begrenzte, subklinische Infektion. Im Gegensatz zur Ranavirusinfektion wird durch hohe Herpesvirusantikörpertiter die Virusausscheidung verhindert. Es bleibt zu vermuten, dass es bei asymptomatischen Ranavirusträgern durch Immunsuppression (Stress) zu erneuten schweren Krankheitssymptomen kommen kann.

#### **5.4 Methoden zum Nachweis von Ranavirus**

Der Nachweis einer Ranavirusinfektion durch Gewebe- oder Tupferproben ist möglich mittels Zellkultur und PCR. Bei Sektionen können intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen einen Hinweis liefern. In dieser Arbeit konnten jedoch nur in 4 von 15 Fällen Einschlusskörperchen, am häufigsten im Zungengewebe, nachgewiesen werden.

Ranavirusgenom konnte in mindestens einem Fall in allen untersuchten Gewebeararten nachgewiesen werden (Hirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Leber, Magen, Pankreas, Dünndarm, Dickdarm, Milz, Niere, Blase, Hoden, Nebenhoden und Muskulatur). Infektiöses Virus konnte mittels TH-1-Zellkultur aus Hirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Leber, Pankreas, Dickdarm, Milz, Niere, Nebenhoden und Muskulatur isoliert werden. Am häufigsten gelang der Virusnachweis im Zungengewebe. Daher sollte bei einer virologischen Untersuchung von seziierten Schildkröten immer das Zungengewebe mit in die Untersuchung eingeschlossen werden. Der Virusnachweis in der Muskulatur erfolgte bei Schildkröte CU60/09 aus der Muskulatur des rechten Vorderbeins. Laut OIE konnte noch keine Ranavirusinfektion der Muskulatur nachgewiesen werden. Virusisolationen aus Muskelgewebe, vermutlich durch im Gewebe enthaltenes Blut, sind jedoch möglich (OIE, 2007).

Die untersuchten Organproben wiesen eine höhere Viruskonzentration auf als die Tupferproben. In der PCR ergaben sich beim Einsatz von Tupferproben meist schwache Banden, während beim Einsatz von Organen häufig starke Banden entstanden. Bei Vertebraten bleibt die Mehrheit der Virionen zellasso-

ziert (WILLIAMS, 1996; CHINCHAR, 2002; CHINCHAR et al., 2005). Aus diesem Grund sind möglicherweise nur wenig Virionen außerhalb der Zellen und in den wenigen abgeschilferten Zellen für Tupferproben zugänglich. Daher eignen sich Organproben besser zum Ranavirusnachweis als Tupferproben. Am lebenden Tier ist jedoch die Gewinnung von Organproben nur schwer möglich und es stellt sich die Frage, ob die höhere Nachweisrate die für das Tier stressigere und schmerzvollere Methode einer Organprobenentnahme rechtfertigt.

Es zeigte sich, dass der Nachweis von Ranavirusgenom viel häufiger mittels PCR als mittels Isolierung in TH-1-Zellkultur gelang. Handelte es sich bei den untersuchten Proben um Tupferproben (Rachen- oder Kloakentupferproben bzw. Tupferproben von der äußeren Oberfläche), so gelang der Nachweis von Ranaviren mittels TH-1-Zellkultur in keinem Fall. Dieses scheint zu einem gewissen Teil durch die für die Zellkultur notwendige Filtration bedingt zu sein. Wurden Tupferproben statt durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,2 µm durch einen Filter mit einer mittleren Porenweite von 0,45 µm filtriert, so ließ sich aus einigen vorher negativen Proben vermehrungsfähiges Ranavirus isolieren. Ein Problem ist jedoch, dass mit steigender Porengröße der Filter nicht nur die Nachweisrate von Ranaviren, sondern auch das Kontaminationsrisiko mit Pilzen und Bakterien ansteigt, so dass eine Auswertung der Zellkultur eventuell nicht möglich ist.

Eine Verschleppung von Virus-DNA während der PCR erscheint unwahrscheinlich, da die mitgeführten Negativkontrollen keine Banden zeigten. Zusätzlich wurde ein Teil der Proben ohne Einsatz von Positivkontrollen untersucht, so dass die Möglichkeit der Kontamination mit Ranavirus durch die Positivkontrollen ausgeschlossen werden konnte. Auch andere Autoren berichteten von positiven Ergebnissen in der PCR, die sich nicht in der Zellkultur bestätigen ließen (WEINMANN, 2007; MARSCHANG et al., 2009).

Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den PCR-Ergebnissen um falsch positive Ergebnisse handelte. Das bedeutet, dass in der PCR zwar Amplifikate der gesuchten Größe entstanden, diese jedoch nicht durch ein Ranavirus hervorgerufen wurden. Daher wurde stichprobenartig ein Teil der erhaltenen Amplifikate sequenziert. Diese acht Amplifikate zeigten alle eine 100 %ige Überein-



stimmung mit den acht sequenzierten Ranavirusisolaten von Schildkröten (354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07, CU60/09 und 882/96). Nach diesem Ergebnis erscheint es sehr unwahrscheinlich, dass die anderen Amplifikate nicht durch Ranavirus-DNA entstanden.

Die Vermutung, dass die Nachweise in der PCR nur durch virale DNA und nicht durch vermehrungsfähige Viren verursacht wurden, ist nach den Ergebnissen dieser Arbeit zumindest bei einem Teil der untersuchten Proben unwahrscheinlich. Bei Schildkröte CU60/09 konnte Ranavirus nicht in den Tupferproben mittels Zellkultur nachgewiesen werden, obwohl der PCR-Nachweis positiv ausfiel. Nur bei der letzten Rachentupferprobe gelang der Virusnachweis nach einer Filtration durch einen Filter mit einer Porenweite von 0,45 µm. Einen Tag später wurde diese Schildkröte eingeschläfert. Aus einer großen Anzahl von Geweben ließ sich daraufhin Ranavirus mittels Zellkultur isolieren. Es ist unwahrscheinlich, dass innerhalb eines Tages eine so starke Infektion verschiedener Gewebearten auftrat. Diese Schildkröte hatte zudem schon vorher für eine Ranavirusinfektion typische Symptome gezeigt, so dass davon auszugehen ist, dass zum Zeitpunkt der Tupferprobennahmen genügend vermehrungsfähiges Virus in den Zellen vorhanden war. Auch „Gertrude“ und „Klaus“ wiesen typische Symptome einer Ranavirusinfektion auf. Während und einige Zeit nach der Erkrankung konnte Ranavirusgenom in der PCR nachgewiesen werden. In der Zellkultur ließ sich jedoch kein Virus isolieren. Die beobachteten Symptome und die Tatsache, dass beide Schildkröten Antikörper gegen Ranavirus entwickelten, spricht sehr dafür, dass beide Schildkröten mit vermehrungsfähigem Virus infiziert waren. Ob jedoch alle PCR-Nachweise durch vermehrungsfähiges Virus und nicht nur virale DNA hervorgerufen wurden, läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht sagen.

Die in meiner Arbeit erhaltenen Ranavirusnachweise mittels PCR, die sich nicht in der TH-1-Zellkultur bestätigen ließen, zeigten meist nur schwache Banden. ROBERT et al. (2007) konnten bei einem großen Anteil (8-36 %) klinisch gesunder *Xenopus laevis* schwache Banden in der Ranavirus-spezifischen PCR nachweisen. Diese Banden wurden mit Hilfe von Southern blotting und zum Teil mittels Sequenzanalyse bestätigt. Wurde bei diesen Fröschen mittels einer subletalen  $\gamma$ -Strahlung eine Immunsuppression vorgenommen, so starben diese

letalen  $\gamma$ -Strahlung eine Immunsuppression vorgenommen, so starben diese mit Anzeichen einer Ranavirus-Infektion (Ödem, Hämorrhagien). In der PCR konnten anschließend starke Ranavirus-spezifische Banden nachgewiesen werden. Eine Sequenzanalyse bestätigte den Nachweis von Ranavirus. So konnte nachgewiesen werden, dass diese schwachen Banden in *Xenopus laevis* durch vermehrungsfähiges Virus, welches eine tödliche Erkrankung auslösen kann, hervorgerufen wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass auch schwache Banden in der PCR einen Hinweis auf vermehrungsfähiges Virus liefern können.

Anhand der vorherigen Ausführungen lässt sich vermuten, dass in den Tupferproben sowie in einigen Organproben zu wenig Virus enthalten ist, um in der Zellkultur einen cpE zu verursachen. Dieses scheint zum Teil durch die für die Zellkultur notwendige Filtration bedingt. Möglicherweise können in der PCR viel geringere Virusmengen nachgewiesen werden, als in der Zellkultur. Erhält man nur ein positives PCR-Ergebnis, so kann es sich trotzdem um vermehrungsfähiges Virus handeln.

In Rachentupferproben ließ sich die Ausscheidung von Ranavirusgenom über einen längeren Zeitpunkt nachweisen als in Kloakentupferproben. Bei „Gertrude“ waren die Rachentupferproben noch acht Wochen nach der letzten positiven Kloakentupferprobe positiv. Bei „Klaus“ betrug dieser Zeitraum sieben Wochen. Bei „Agatha“ ließ sich nur in den Rachentupferproben Ranavirusgenom nachweisen. Vier Monate nach der letzten positiven Rachentupferprobe löste sich bei „Gertrude“ ein Stück Horn vom Plastron. In diesem Stück und in Tupferproben vom betroffenen Gewebe ließ sich Ranavirusgenom nachweisen. Horngeschabsel erscheinen aber kein generell besonders gut geeignetes Nachweissubstrat zu sein, weil in Geschabseln von unverdächtigem Gewebe kein Ranavirusnachweis gelang. Ist die Probenanzahl pro Tier beschränkt, sollte der Rachentupferprobe der Vorrang gegeben werden. Zusätzlich sollte immer auf auffällige Gewebeeränderungen geachtet und diese extra beprobt werden. Es müsste noch untersucht werden, ob es besser geeignetes Probenmaterial zur Untersuchung auf das Vorhandensein von Ranavirus gibt. ST-AMOUR und LESBARRÈRES (2007) setzten erfolgreich toe clips von Anuren zum Ranavirus-

nachweis ein. Über den Schaden und Nutzen des Einsatzes dieser sehr invasiven Methode muss jedoch ausgiebig diskutiert werden.

Die Versuche zur PCR-Optimierung lieferten bisher wenig aussagekräftige Ergebnisse. Jedoch stellte sich die PCR im Gegensatz zur Zellkultur als ein sehr sensitives Nachweisverfahren heraus, denn es konnte in deutlich mehr Fällen ein positives Ergebnis erzielt werden als mit der Anzüchtung in der Zellkultur. Bei fraglichen Ergebnissen wurde die PCR mit Einsatz von mehr Probenmaterial wiederholt. Dabei bestand jedoch immer die Gefahr, dass durch gleichzeitiges Erhöhen der möglicherweise in der Probe enthaltenen inhibierenden Substanzen kein Amplifikat mehr gebildet wurde.

### **5.5 Spezieszugehörigkeit der untersuchten Ranavirusisolate**

Laut CHINCHAR et al. (2005) weist ein Stamm innerhalb einer Spezies mehr als 70 % gleiche Banden im Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus und mehr als 95 % Übereinstimmung in seiner Gensequenz auf. Gemäß dieser Definition bilden die acht von Schildkröten stammenden Virusisolate 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08, 6172/07, CU60/09 und 882/96 einen Stamm. Bei der Sequenzanalyse eines Teils des MCP-Gens zeigten alle acht Viren eine 100 %ige Übereinstimmung. Bei der Restriktionsenzymanalyse wiesen die sechs Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08 und CU60/09 eine 100 %ige Übereinstimmung auf. Die beiden Viren 6172/07 und 882/96 zeigten nur geringe Unterschiede in ihrem Bandenmuster (96,3 % bzw. 81 % Übereinstimmung).

Somit scheinen die sechs Viren 354/08, 4152/07, 5187/07, 5810/07, CU10/08 und CU60/09 nicht untereinander unterscheidbar zu sein. Virus 6172/07 zeigte nur bei der Spaltung mit dem Enzym XbaI ein fehlendes sowie ein zusätzliches Fragment. Virus 882/96 wies nach der Spaltung mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (HindIII, XbaI und KpnI) Unterschiede zu den anderen Schildkrötenviren auf. Dieses sind eventuell Unterschiede, die innerhalb eines Virusstammes durch einzelne genetische Variationen im Lauf der Jahre aufgetreten sind. Virus 882/96 wurde bereits im Jahr 1996 isoliert, während die übrigen sieben Schildkrötenviren in den Jahren 2007 bis 2009 isoliert wurden. Eventuell

sind diese geringen Unterschiede auch auf eine Speziespezifität zurück zu führen. Isolat 882/96 wurde aus einer *Testudo kleinmanni* isoliert, wohingegen die anderen Viren aus *Testudo hermanni* bzw. Virus CU60/09 aus einer *Testudo marginata* stammten.

Die beiden von Amphibien stammenden Viren FV-3 und 1834/04 zeigten in der Restriktionsenzymanalyse sowohl eine nur geringe Übereinstimmung untereinander (37,8 %) als auch im Vergleich zu den Schildkrötenviren (max. 25,3 % bzw. 33,3 %). In der Sequenzanalyse eines Teils des MCP-Gens wiesen sie eine viel höhere Übereinstimmung auf. Dort zeigte sich eine Übereinstimmung von 99,8 % untereinander sowie 98,6 % von FV-3 bzw. 98,3 % von 1834/04 mit den Schildkrötenviren. Dabei muss bedacht werden, dass bei der Restriktionsenzymanalyse das gesamte Genom eingesetzt wurde, während bei der Sequenzanalyse nur ein kleiner Teil des Genoms analysiert wurde. In der Sequenzanalyse wurde ein Stück des MCP-Gens, einer hoch konservierten Region (TIDONA et al., 1998; ESSBAUER und AHNE, 2001; CHINCHAR et al., 2005), untersucht. Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, dass in der Sequenzanalyse eine viel höhere Übereinstimmung zu erkennen ist als in der Restriktionsenzymanalyse. Aufgrund dessen und gemäß der Definition von CHINCHAR et al. (2005) gehören die beiden Amphibienranaviren zu sowohl untereinander als auch von dem Schildkrötenvirusstamm unterscheidbaren Stämmen.

MAO et al. (1996) und TIDONA et al. (1998) halten das MCP-Gen für geeignet, um auch nah verwandte Iridovirusisolate unterscheiden zu können. Bei Betrachtung der in der eigenen Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigte sich jedoch, dass die Sequenzanalyse dieses konservierten Genomstückes eine höhere Identität vortäuscht als tatsächlich gegeben ist. Die Vorteile der Sequenzanalyse dieses Teilstückes sind der einfache Erhalt des Amplifikats durch die Ranavirus-spezifische PCR und die einfache und kostengünstige Durchführung. Wird daher nur die Analyse des MCP-Gens durchgeführt, sollte beim Vergleich mit anderen Virusisolaten bedacht werden, dass die prozentualen Unterschiede des gesamten Genoms erheblich größer ausfallen können.

Der Vergleich der Schildkrötenisolate mit in den DNA-Sequenzdatenbanken hinterlegten Sequenzen ergab eine maximale Übereinstimmung von 98,8 % mit

dem MCP-Gen des *Rana catesbeiana* virus JP (AB474588.1), des FV-3 Isolat NT628 (GQ144407.1), des Soft-shelled turtle iridovirus (EU627010.1) und des Iridovirus RGV-9806 (AF192509.1). Diese Viren weisen jedoch eine deutlich nähere Verwandtschaft zu FV-3 auf (99,8 % Übereinstimmung). Aufgrund der oben aufgeführten Unterschiede bei der Analyse des gesamten Genoms oder eines Stücks einer konservierten Region, ist davon auszugehen, dass diese Viren (*Rana catesbeiana* virus JP, FV-3 Isolat NT628, Soft-shelled turtle iridovirus und Iridovirus RGV-9806) im Vergleich zu den Schildkrötenisolaten deutlich mehr Differenzen bei Betrachtung des gesamten Genoms aufweisen. Die von mir untersuchten Schildkrötenviren bilden daher einen eigenen, bisher noch nicht in DNA-Sequenzdatenbanken hinterlegten Stamm.

Es stellt sich die Frage, woher dieser neue Virusstamm kommen könnte. Es besteht die Vermutung, dass das Ranavirus über kürzlich importierte, bereits infizierte Schildkröten eingeschleppt worden ist (s. Punkt 5.6). Es ließ sich retrospektiv nicht sicher nachvollziehen, woher diese Schildkröten stammten. Bisher sind noch keine Erkrankungsfälle nach Infektion mit Ranavirus aus dem natürlichen Verbreitungsgebiet europäischer Landschildkröten (Mittelmeerraum) bekannt. Möglicherweise treten dort nur wenige Erkrankungsfälle auf, die nicht besonders zur Kenntnis genommen werden. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die Schildkröten in ihrem natürlichen Verbreitungsgebiet zwar mit Ranavirus infiziert sind, dort aber gar keine Erkrankungen auftreten und dass erst durch den Stress des Transports und der damit einhergehenden Immunsuppression eine Virusvermehrung ausgelöst wird. Es ist auch denkbar, dass beim Importeur Ranavirus von anderen infizierten Tieren (z. B. Frösche) aufgrund von räumlicher Nähe und Stress auf die Schildkröten überspringen konnte.

Das geographisch und von der betroffenen Spezies nächste Ranavirusisolat, dessen Sequenz analysiert wurde, stellt ein Ranavirusisolat einer *Testudo hermanni* aus der Schweiz dar (MARSCHANG et al., 1999). Dieses Ranavirusisolat (AF114154) weist eine 98,6 %ige Übereinstimmung zu FV-3 und eine 98,0 %ige Übereinstimmung zu den von mir untersuchten Schildkrötenvirusisolaten auf. Vielleicht bildet es eine Zwischenstufe zwischen den von mir untersuchten Schildkrötenviren und den FV-3-ähnlichen Ranaviren. Überraschend

ist, dass dieses Virus trotz der ähnlichen Vorgeschichte (geographische und zeitliche Nähe, auch *Testudo hermanni* betroffen) eine größere Divergenz aufweist als die von mir untersuchten Isolate, die eine zu 100 % übereinstimmende Sequenz zeigen. Die von mir untersuchten Isolate stammten zwar alle von in Deutschland gehaltenen Schildkröten, jedoch von drei verschiedenen Spezies (*Testudo hermanni*, *Testudo kleinmanni* und *Testudo marginata*) und wurden über einen Zeitraum von mehr als zehn Jahren isoliert (1996 bis 2009).

Die erhaltene Sequenz der von mir analysierten Schildkrötenranavirusisolate weist eine maximale Übereinstimmung von 98,8 % zu Amphibienisolaten auf (s.o.). Mit Ranaviren von Fischen besteht nur eine geringere Übereinstimmung. Die Schildkrötenisolate stimmen zu 97,9 % mit der Sequenz des Epizootic haematopoietic necrosis virus (FJ 433873.1) und zu 97,1 % mit den Sequenzen des European sheatfish virus (FJ 358609.1) bzw. des European catfish virus (FJ 358608.1) überein. Dieses zeigt, dass die Schildkrötenisolate näher mit Amphibienranaviren verwandt sind als mit Fischranaviren. Auch HUANG et al. (2009) konnten bei einer Sequenzanalyse des kompletten Genoms des Soft-shelled turtle iridovirus eine nähere Verwandtschaft mit Amphibien- als mit Fischranaviren nachweisen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Schildkrötenranaviren in ihrer phylogenetischen Entwicklung ursprünglich von Amphibienranaviren abstammen. Diese enge genetische Verwandtschaft läßt die Übertragung von Ranavirus von Amphibien auf Reptilien möglich erscheinen.

## 5.6 Epidemiologie, Pathogenese und Therapie

Die Erkrankungen scheinen, soweit es sich nachvollziehen ließ, in den betroffenen Beständen durch Zukauf klinisch gesunder, Ranavirus-infizierter Schildkröten eingeschleppt worden zu sein. Interessant ist, dass früher nur sporadisch Erkrankungen durch Ranavirus aufgetreten sind und in den Jahren 2007 und 2008 plötzlich viele Schildkröten in mehreren Beständen erkrankten. Es ist unwahrscheinlich, dass dieses plötzliche gehäufte Auftreten von Krankheitsfällen zufällig entstanden ist. Eventuell stammten alle Zukauftiere aus demselben Bestand. Es ließ sich nicht sicher klären, aus welcher Quelle die betroffenen

Schildkröten bezogen wurden. Eventuell handelte es sich um Wildfänge aus illegalen Importen. Für die Vermutung, dass die von mir untersuchten Ranaviren ursprünglich eine gemeinsame Herkunft haben, spricht, dass die Isolate sehr nah verwandt und viele sogar identisch sind (s. Punkt 5.5).

Eine weitere Möglichkeit ist, dass früher Erkrankungen durch Ranavirus nicht diagnostiziert worden sind. Symptomatisch ähnelt diese der viel häufiger diagnostizierten Erkrankung durch Herpesviren und kann deshalb leicht verwechselt werden. Wird eine Abklärung der Krankheitsursache mittels Zellkultur oder PCR vorgenommen, so lassen sich beide Viren deutlich voneinander unterscheiden. Es bleibt abzuwarten, wie sich das Krankheitsgeschehen in Deutschland weiter entwickelt. Erst in einigen Jahren lässt sich sagen, ob es sich um eine einmalige Erkrankungswelle gehandelt hat.

Es wurde beobachtet, dass juvenile Amphibien häufiger und schwerer nach Infektionen mit Ranavirus erkranken als Adulte (DASZAK et al., 1999; GREEN et al. 2002). Bei Schildkröten wurden Erkrankungsfälle sowohl bei Jungtieren (CHEN et al., 1999; MARSCHANG et al., 1999) als auch bei Adulten (WESTHOUSE et al., 1996; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007) berichtet. Bei den hier untersuchten Fällen handelte es sich meist um adulte Schildkröten. Diese Tatsache muss jedoch nicht unbedingt aussagen, dass adulte Schildkröten häufiger erkranken. Möglicherweise waren in den Beständen nur adulte Schildkröten vorhanden, die Jungtiere und Adulten wurden getrennt gehalten oder es wurde nur bei adulten Schildkröten eine labordiagnostische Abklärung angestrebt. In Bestand M erkrankten nur Adulte und keines der Jungtiere, obwohl diese in derselben Gruppe gehalten wurden. Aus Bestand E wurde von Erkrankungen sowohl von Adulten als auch von Jungtieren berichtet. Bisher lässt sich noch keine eindeutige Aussage machen, ob das Alter eine Rolle bei der Wahrscheinlichkeit und der Schwere der Erkrankung spielt.

Auffällig war, dass nicht alle Schildkröten einer Gruppe erkrankten. Es gibt bisher keinen ersichtlichen Grund, warum nur ein Teil der Schildkröten erkrankte. Bei den nicht erkrankten Schildkröten konnten keine Antikörper nachgewiesen werden, so dass es unwahrscheinlich ist, dass sie durch eine vorhergehende Infektion mit Ranavirus und eine darauf folgende Antikörperbildung geschützt

waren. Es waren keine auffälligen Unterschiede (Alter, Geschlecht, Herkunft etc.) zwischen erkrankten und nicht erkrankten Schildkröten ersichtlich.

Ein notwendiger, enger Kontakt zur Virusübertragung könnte eine Erklärung sein, warum nur ein Teil der Schildkröten erkrankte. Dass Ranaviren sich von Tier zu Tier durch direkten Kontakt verbreiten, erscheint wahrscheinlich, da räumlich getrennte Schildkröten nicht erkrankten. Bei Amphibien können Ranaviren durch kontaminiertes Futter oder über Exposition in einer virushaltigen Umwelt übertragen werden (DASZAK et al., 1999; CHINCHAR et al., 2005). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass auch bei Schildkröten eine indirekte Übertragung über die Umwelt, beispielsweise durch kontaminiertes Wasser oder andere Tiere (z. B. Frösche), möglich ist. Für diese Annahme wurden in der eigenen Arbeit jedoch keine Anhaltspunkte gefunden. Hingegen traten in Bestand E in einem räumlich getrennten Gehege erst Erkrankungsfälle auf, nachdem ein Männchen aus diesem Gehege für einige Stunden in einem anderen Gehege mit erkrankten Schildkröten gewesen war. Bevor jedoch nicht sicher nachgewiesen ist, dass die Virusübertragung nicht über Hände, Schuhe, Futter etc. erfolgen kann, sollten erkrankte Schildkröten strikt von gesunden Schildkröten getrennt gehalten werden und alle Gegenstände, die mit erkrankten Tieren in Kontakt gekommen sind, desinfiziert werden.

Die während meiner Arbeit beobachteten Schildkröten zeigten unterschiedlich schwere Krankheitsverläufe. Die Erkrankungsdauer zog sich bei einigen Schildkröten über mehrere Monate hin. Die Schwere und Dauer der Erkrankung können von verschiedenen Faktoren abhängig sein. Die aufgenommene Virusmenge, der Immunstatus und der Gesundheitszustand der Tiere sowie äußere Faktoren (z. B. Temperatur) können eine Rolle spielen. Manche Schildkröten zeigten als einziges Symptom eine Anorexie (s. „Fips“). Im Infektionsversuch von JOHNSON et al. (2007) konnte nach oraler Infektion als einziges Symptom eine kurzzeitige Anorexie beobachtet werden, so dass eventuell auch der Weg der Virusübertragung eine Rolle bei der Art und Schwere der Ausprägung der Krankheitssymptome spielt.

Wenn in einem Bestand Erkrankungen durch Ranavirus auftreten oder vermutet werden, sollte bei allen Schildkröten am besten täglich die Maulhöhle kontrol-



liert werden, um keine erkrankten Tiere zu übersehen. Beläge in der Maulhöhle können das einzige sichtbare Anzeichen einer Infektion und eventuell nur für wenige Tage erkennbar sein (s. „Agatha“).

„Gertrude“ zeigte einen Verlust der rostralen Hälfte des Unterkiefers sowie eines Stücks Horn vom Plastron, nachdem sie an den Folgen einer Ranavirusinfektion erkrankt war. Beides scheint nicht auf Verletzungen durch äußere Einflüsse zurückzuführen zu sein. Es war kein Trauma beobachtet worden. Die offenliegende Fläche des Schnabels wies zudem keine Anzeichen einer akuten Verletzung (z. B. Blutung) auf. Es schien, als sei die vordere Schnabelhälfte nekrotisch geworden und daraufhin abgefallen. Zum Zeitpunkt des Verlusts der Schnabelhälfte ließ sich in den Rachentupferproben Ranavirusgenom nachweisen. In dem abgelösten Hornstück sowie in Tupferproben vom unterliegenden Gewebe ließ sich ebenfalls Ranavirusgenom nachweisen, während der Ranavirusnachweis aus intaktem Panzergewebe nicht gelang. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Ranavirusinfektion für diese Befunde ursächlich ist. In Bestand E traten in neuerer Zeit bei einigen Schildkröten Nekrosen des Panzers auf. Der Besitzer berichtete, dass es vor den Erkrankungen in Folge einer Ranavirusinfektion noch nie zu Panzernekrosen gekommen war.

Ranaviren können in infizierten Zellen zur Apoptose führen (CHINCHAR et al., 2003). Sie können sich nur bei Temperaturen bis zu 32 °C vermehren (s. Punkt 5.2). Eventuell konnten sich die Ranaviren in den infizierten Schildkröten nur noch in kälteren Körperregionen (Panzer, Akren) vermehren und führten dort durch Apoptose zur Nekrose von ganzen Gewebestücken. Denkbar ist aber auch, dass sich die Ranaviren aufgrund hoher Körpertemperatur oder einer effektiven Immunantwort nicht weiter vermehren konnten, jedoch einen toxischen Effekt, wie von BINGEN et al. (1982) und ESSBAUER und AHNE (2001) bei Mäusen und Ratten beschrieben, hervorriefen. Die Toxine sammelten sich möglicherweise bevorzugt in kälterem oder schlechter durchblutetem Gewebe an und führten dort zur Nekrose.

Bei den erkrankten Schildkröten wurde eine hohe Mortalität beobachtet. Auch in den meisten bisher publizierten Fällen von Erkrankungen durch Ranavirus starben die Schildkröten oder wurden aufgrund schwerwiegender Symptome ein-

geschläfert (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996; CHEN et al., 1999; MARSCHANG et al., 1999; DE VOE et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; JOHNSON et al., 2008). Nur JOHNSON et al. (2004) und BENETKA et al. (2007) berichten von einer überlebenden *Geochelone pardalis pardalis* bzw. zwei genesenen *Geochelone platynota*.

Zur Behandlung werden Flüssigkeitssubstitution, Vitamin- und Glukosegaben sowie Antiinfektiva empfohlen (MÜLLER et al., 1988; JOHNSON et al., 2004; ALLENDER et al., 2006; BENETKA et al., 2007). In der eigenen Arbeit wurden ebenfalls palliative Maßnahmen (Flüssigkeits- und Glukosegabe) eingesetzt. Sekundärinfektionen sollten zusätzlich gezielt therapiert werden. Bei vielen der erkrankten Schildkröten konnte ein massiver Befall mit *Oxyuren* spp. nachgewiesen werden. Es ist noch nicht bekannt, ob der Parasitenbefall einen Einfluss auf den Verlauf einer Erkrankung durch Ranavirus hat. Eventuell waren durch Parasiten geschwächte Schildkröten anfälliger für eine Ranavirusinfektion oder erkrankten schwerer. Möglicherweise konnten sich auch die Parasiten in durch Ranavirus geschwächten Schildkröten besser vermehren. Die Therapie scheint keinen signifikanten Einfluss auf die Heilung zu haben (DE VOE et al., 2004). Sie kann vermutlich nur unterstützend wirken.

## 5.7 Empfehlungen und Ausblick

Bei klinischem Verdacht (Stomatitis mit Belägen in der Maulhöhle, Lethargie, Anorexie, Konjunktivitis, Nasenausfluss) ist die PCR die sensitivste Methode, um das Vorliegen einer Ranavirusinfektion zu bestätigen. Zusätzlich sollte jedoch immer versucht werden, das Virus in TH-1-Zellkultur zu isolieren, da nur so bestätigt werden kann, dass es sich um vermehrungsfähiges, infektiöses Virus und nicht nur Genomreste handelt. Da der Nachweis in Zellkultur häufig nicht gelingt, wäre es ideal, wenn in der PCR erhaltene Banden sequenziert würden, um zu bestätigen, dass die Amplifikate zum Ranavirusgenom gehören. Dieses wird jedoch aus Kostengründen in der Routinediagnostik nicht immer durchführbar sein. Nach der Sektion kann die histopathologische Untersuchung einen Anhaltspunkt für eine Ranavirusinfektion liefern, falls intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen erkennbar sind. Da bei den in der eigenen Arbeit

---

untersuchten Schildkröten jedoch nur bei 4 von 15 Schildkröten Einschlusskörperchen zu finden waren, ist bei dieser Untersuchung nur ein positives Ergebnis aussagekräftig.

Bestätigt sich der Ranavirusverdacht, sollten gesunde und erkrankte Schildkröten getrennt werden, um weitere Ansteckungen zu verhindern. Erkrankte Schildkröten sollten je nach Ausmaß der Symptome mit palliativen Maßnahmen und Antiinfektiva behandelt werden. Zusätzlich erscheint es sinnvoll, auf eine optimale Temperatur zu achten, um die Virusvermehrung zu verhindern und das Immunsystem der Schildkröte zu unterstützen.

Vor dem Zukauf neuer Schildkröten sollte immer eine Quarantäne durchgeführt werden. Die Quarantäne sollte mindestens acht Wochen, besser jedoch ein Jahr dauern (WIECHERT, 2000). Schildkröten können mit Hilfe des ELISA auf das Vorhandensein von Antikörpern überprüft werden. Zusätzlich können Tupferproben aus Rachen und Kloake mittels PCR untersucht werden, da erkrankte Schildkröten anscheinend über einen längeren Zeitraum auch ohne Vorhandensein von klinischen Symptomen Ranavirus ausscheiden.

Es stand nur eine geringe Anzahl an erkrankten und genesenen Schildkröten zur Verfügung, so dass sich bisher nur wenig gesicherte Aussagen zur Pathogenese machen lassen. Jedoch entstanden einige Ideen bezüglich der Übertragung von Ranaviren und zum Verlauf der Erkrankung. Mit dem selbst entwickelten ELISA steht nun eine Möglichkeit zum Nachweis von Antikörpern zur Verfügung. Die Erkenntnisse meiner Arbeit liefern eine gute Grundlage, auf der weitere Forschungen folgen können, um die bisher noch wenig bekannte Erkrankung nach spontaner Infektion mit Ranavirus bei Schildkröten besser verstehen zu können.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Erkrankungen nach einer Infektion mit Ranavirus bei Landschildkröten (*Testudo hermanni*, *Testudo marginata*, *Testudo graeca* und *Testudo kleinmanni*) aus acht verschiedenen Beständen in Deutschland untersucht. Acht Virusisolate (882/96, 4152/07, 5187/07, 5810/07, 6172/07, 354/08, CU10/08 und CU60/09) aus diesen Beständen wurden eingehend analysiert. Zum Vergleich wurden zwei Ranavirusisolate aus Amphibien, die Typspezies Frog virus 3 (FV-3) und das Isolat 1834/04 aus einem Kweichow Krokodilmolch (*Tylosotriton kweichowensis*), mitgeführt. Die Bestätigung dieser zehn Isolate als Angehörige des Genus *Ranavirus*, Familie *Iridoviridae*, erfolgte mittels Chloroform- und IUDR-Test, der Ranavirus-spezifischen PCR sowie des Ranavirus-typischen cpE in der TH-1-Zellkultur.

Die Vermehrung der zehn Isolate wurde in verschiedenen Zellkulturen (TH-1, VH2, SFT, Na, MDBK, BGM, BHK und KOP) bei 28 °C und 37 °C untersucht. Alle Isolate vermehrten sich bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C, jedoch nicht bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C. Am stärksten vermehrten sich die Isolate in der TH-1-Zellkultur (mindestens  $KID_{50}$  von  $10^{10,4}$  je ml), so dass eine Inkubation bei 28 °C auf TH-1-Zellen als Methode der Wahl zur Isolierung von Ranavirus in Zellkulturen zu empfehlen ist. Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C zeigten sich in einigen Zelllinien (BGM, BHK, KOP, SFT und Na) zytopathische Veränderungen, eine Virusvermehrung war aber nicht nachweisbar. Der cpE wurde in diesen Zellkulturen vermutlich durch einen toxischen Effekt der Ranaviren hervorgerufen.

Nach der Spaltung des gesamten Genoms mit den Enzymen EcoRI, HindIII, XbaI und KpnI sowie bei der Sequenzanalyse eines Teils des MCP-Gens zeigte sich, dass die acht Ranavirusisolate aus Schildkröten untereinander identisch (4152/07, 5187/07, 5810/07, 354/08, CU10/08 und CU60/09) bzw. sehr nahe verwandt (882/96 und 6172/07) sind. Die beiden Ranavirusisolate aus Amphibien (FV-3 und 1834/04) wiesen bei der Restriktionsenzymanalyse eine maximale Übereinstimmung von 33,3 % zu den Ranavirusisolaten aus Schildkröten auf, so dass die von mir untersuchten Isolate aus Schildkröten nach der Definition von CHINCHAR et al. (2005) einen eigenen phylogenetischen Virusstamm

bilden. Auch der Vergleich dieser Schildkrötenisolate mit in den DNA-Sequenzdatenbanken hinterlegten Sequenzen anderer Ranaviren ergab keine nahe Verwandtschaft, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die bisher aufgetretenen Erkrankungsfälle in Deutschland von einem einzigen, bisher nicht in den DNA-Sequenzdatenbanken hinterlegten Ranavirus hervorgerufen wurden.

Die bestehenden Methoden zum Nachweis von Ranaviren wurden überprüft. Es zeigte sich, dass der Nachweis von Ranavirus mittels PCR deutlich häufiger gelang als mittels Zellkultur (Signifikanz von  $p < 0,001$ ). Von den 400 untersuchten Organ- und Tupferproben waren 133 positiv in der PCR und nur 10 positiv in der TH-1-Zellkultur. Bei Verwendung eines Membranfilters mit einer mittleren Porenweite von  $0,45 \mu\text{m}$  statt  $0,2 \mu\text{m}$  zum Filtrieren der Probensuspensionen vor Inokulation der TH-1-Zellkultur ließ sich aus 2 von 38 vorher nur in der PCR positiven Tupferproben Ranavirus in der TH-1-Zellkultur isolieren. In den Versuchen zur Optimierung der PCR-Methode durch Veränderung der Zusammensetzung des Mastermixes, der Probenmenge, der Temperatur sowie der Zyklenanzahl und -dauer zeigten sich kaum Unterschiede zu der bisher verwendeten Methode von MAO et al. (1997).

Bei epidemiologischen Untersuchungen gelang der Virusnachweis mittels PCR in Rachentupferproben ehemals erkrankter Schildkröten bis zu acht Wochen länger als in Kloakentupferproben. Bis zu sieben Wochen nach der Genesung von einer spontanen Infektion ließen sich Teile des Ranavirusgenoms in Rachentupferproben nachweisen. Es konnte nicht bewiesen werden, dass nachgewiesene Teile des Ranavirusgenoms immer von vermehrungsfähigem Virus stammen. In einigen Fällen konnte jedoch vermehrungsfähiges Virus isoliert werden bzw. schien aufgrund des Krankheitsverlaufs das Vorliegen von vermehrungsfähigem Virus sehr wahrscheinlich.

Bisher bestand in Europa keine Möglichkeit zum Nachweis von Ranavirus-spezifischen Antikörpern im Serum oder Blutplasma von Schildkröten. Aus diesem Grund war es ein weiterer wichtiger Teil meiner Arbeit, ein geeignetes Testverfahren zum Antikörpernachweis zu etablieren. Mittels klassischen Neutralisationstests in TH-1-Zellkulturen ließen sich keine neutralisierenden

Antikörper nachweisen. Daher wurde von mir ein ELISA zum Antikörpernachweis entwickelt und auf Spezifität und Sensitivität überprüft. 227 Seren von erkrankten, genesenen und unverdächtigen Schildkröten wurden mit diesem ELISA auf das Vorhandensein von Ranavirus-spezifischen Antikörpern untersucht. Bei allen genesenen Schildkröten ließen sich Antikörper nachweisen. Alle Schildkröten ohne bekannte Ranavirusinfektion wiesen keine Antikörper auf. Es wurden Untersuchungen zum Verlauf der Antikörpertiter durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass die Antikörpertiter über den untersuchten Zeitraum (bis zu zwei Jahren) stetig anstiegen. Die Dauer bis zum Beginn der Bildung nachweisbarer Antikörper sowie die Höhe der Antikörpertiter scheinen von der Schwere der vorausgehenden Erkrankung abhängig zu sein. Schildkröten, die schwere Krankheitssymptome gezeigt hatten, wiesen früher höhere Antikörpertiter (z. B. ELISA-Wert 37,94/18,97 zwei Jahre nach der Erkrankung) auf als Schildkröten, die nur leicht erkrankt waren (z. B. ELISA-Wert 12,71/3,43 zwei Jahre nach der Erkrankung).

## 7 SUMMARY

### **Detection of ranavirus infections in tortoises and characterisation of virus isolates**

The focus of the research done for this dissertation was mainly centered on the study of diseases among tortoises (*Testudo hermanni*, *Testudo marginata*, *Testudo graeca* and *Testudo kleinmanni*) following infections by ranaviruses. The tortoises being studied stemmed from eight populations that lived in different places in Germany. Eight virus isolates (882/96, 4152/07, 5187/07, 5810/07, 6172/07, 354/08, CU10/08 and CU60/09) of the respective populations were examined in detail. For comparison, two ranavirus isolates of amphibians, the type species Frog virus 3 (FV-3) and the isolate 1834/04 of a red tailed knobby newt (*Tylototriton kweichowensis*), were employed for comparisons. Affirmation of the ten isolates being members of the genus *Ranavirus*, family *Iridoviridae*, was proven using chloroform and IUDR tests, ranavirus-specific PCR and ranavirus-typical cpE in TH-1 cell culture.

The virus replication of all ten isolates was tested in various cell lines (TH-1, VH2, SFT, Na, MDBK, BGM, BHK and KOP) at an incubation temperature of 28 °C and 37 °C. All of the isolates replicated at an incubation temperature of 28 °C, but none of them did at a temperature of 37 °C. The highest replication rate of the isolates could be reached in TH-1 cell cultures (at least  $KID_{50} 10^{10.4}$  per ml), making an incubation at a temperature of 28 °C in TH-1 cell culture the first choice when isolating ranavirus in cell culture. At an incubation temperature of 37 °C some cell lines (BGM, BHK, KOP, SFT and Na) showed cytopathic alterations, though a virus replication was not verifiable. The cpE in these cell cultures is likely to be evoked through a toxic effect of the ranaviruses.

Cleavage of the complete genome using the enzymes EcoRI, HindIII, XbaI and KpnI as well as the sequence analysis of a part of the MCP-gene both revealed that the eight ranavirus isolates of chelonians were identical (4152/07, 5187/07, 5810/07, 354/08, CU10/08 and CU60/09) or closely related to each other (882/96 and 6172/07). The restriction endonuclease analysis of the two ranavi-

rus isolates of amphibians (FV-3 and 1834/04) displayed a maximum correlation of 33.3 % with the ranavirus isolates of chelonians. Thus, according to the definition of CHINCHAR et al. (2005), the isolates of chelonians studied for this research paper form a separate phylogentic virus tree. In addition, the comparison of these chelonid isolates with sequences of other ranaviruses deposited in DNA sequence databases did not reveal a close relation, leading to the likely assumption that the diseases having occurred in Germany so far were caused by a sole ranavirus that until then had not been deposited in DNA sequence databases.

Existing techniques for detecting ranaviruses were tested and verified. Results have shown that detection using PCR succeeded more frequently than detection using cell culture. Among the 400 organ and swab samples studied, 133 have proven to be positive in PCR whereas only 10 were proven positive in TH-1 cell culture. Usage of a membrane filter with an average pore size of 0.45  $\mu\text{m}$  instead of 0.2  $\mu\text{m}$  for filtration of sample suspensions before the inoculation of TH-1 cell cultures resulted in the successful isolation of ranaviruses in 2 out of 38 previously only in PCR positive swab samples. Efforts to optimize the PCR technique by variations of the composition of the mastermix, the amount of sample, the temperature as well as the number and period of cycles did not show any improvement compared to the until then used technique described by MAO et al. (1997).

Epidemiological examinations have shown that the detection of virus using PCR in pharyngeal swab samples of formerly diseased chelonians succeeded up to eight weeks longer than in cloacal swab samples. Up to seven weeks after the recovery from a spontaneous infection parts of ranavirus genome were detectable in pharyngeal swab samples. However, it could not be proven that the detected parts of ranavirus genome always originate from replication competent virus. In some cases however, the replicating virus could be isolated, or moreover, the existence of this virus seemed likely due to the progression of the disease.

So far there has been no possibility in Europe to detect ranavirus-specific antibodies in serum or blood plasma of chelonians. Due to this fact it was another



---

important duty of my work to develop an adequate assay for the detection of antibodies. Presence of neutralising antibodies could not be verified using classical neutralisation assays in TH-1 cell culture. Therefore, an ELISA for the detection of antibodies was developed, its specificity and sensitivity was verified. Using this ELISA, 227 sera of diseased, recovered and unsuspecting chelonians were tested in order to detect ranavirus-specific antibodies. Blood samples of all recovered tortoises contained antibodies. No antibodies were found among all of the tortoises without a verified history of ranavirus infection.

Research on the time sequence of the development of antibody titres was done. The results showed a steady increase of antibody titres during the entire time period of investigation (up to two years). The duration of time that passed between the infection and the production of detectable antibodies as well as the level of antibody titres seem to depend on the severity of the preceding disease. Chelonians which had shown severe symptoms of disease revealed higher antibody titres (e. g. ELISA value 37.94/18.97 two years after disease) at an earlier point of time than chelonians with only minor signs of diseases (e. g. ELISA value 12.71/3.43 two years after disease).

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- AHNE, W., BREMONT, M., HEDRICK, R. P., HYATT, A. D. und WHITTINGTON, R. J. (1997): Special topic review: Iridoviruses associated with epizootic haematopoietic necrosis (EHN) in aquaculture. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **13**, 367-373.
- ALLENDER, M. C., FRY, M. M., IRIZARRY, A. R., CRAIG, L., JOHNSON, A. J. und JONES, M. (2006): Intracytoplasmic inclusions in circulating leukocytes from an eastern box turtle (*Terrapene carolina carolina*) with iridoviral infection. *Journal of Wildlife Diseases* **42**, 677-684.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. und LIPMAN, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**, 403-410.
- ALVES DE MATOS, A. P., PAPERNA, I. und CRESPO, E. (2002): Experimental infection of lacerids with lizard erythrocytic viruses. *Intervirology* **45**, 150-159.
- ARIEL, E. (1997): Pathology and serological aspects of *Bohle iridovirus* infections in six selected water-associated reptiles in North Queensland. PhD thesis, James Cook University, Queensland.
- BENETKA, V., GRABENSTEIN, E., GUMPENBERGER, M., NEUBAUER, C., HIRSCHMÜLLER, B. und MÖSTL, K. (2007): First report of an iridovirus (Genus *Ranavirus*) infection in a leopard tortoise (*Geochelone pardalis pardalis*). *Veterinary Medicine Austria/ Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **94**, 243-248.
- BINGEN, A., BOUTEILLE, M. und KIRN, A. (1982): Localization by autoradiography of viral proteins in the parenchymal cells of the liver during frog virus 3 induced hepatitis of mice. *Journal of Submicroscopic Cytology* **14**, 55-62.
- BRADFORD, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254.
- BROWN, D. R., CRENSHAW, B. C., MCLAUGHLIN, G. S., SCHUHMACHER, I. M., MCKENNA, C. E., KLEIN, P. A., JACOBSON, E. R. und BROWN, M. B. (1995): Taxonomic Analysis of the tortoise mycoplasmas *Mycoplasma agassizii* and *Mycoplasma testudinis* by 16S rRNA Gene Sequence Comparison. *International Journal of Systematic Bacteriology* **45**, 348-350.
- BRUNNER, J. L., SCHOCK, D. M., DAVIDSON, E. W. und COLLINS, J. P. (2004): Intraspecific reservoirs: complex life history and the persistence of a lethal ranavirus. *Ecology* **85**, 560-566.

- 
- BRUNNER, J. L., RICHARDS, K. und COLLINS, J. P. (2005): Dose and host characteristics influence virulence of ranavirus infections. *Oecologia* **144**, 399-406.
- BRUNNER, J. L., SCHOCK, D. M. und COLLINS, J. P. (2007): Transmission dynamics of the amphibian ranavirus *Ambystoma tigrinum* virus. *Diseases of Aquatic Organisms* **77**, 87-95.
- BUNDESMINISTERIUM FÜR ERNÄHRUNG, LANDWIRTSCHAFT UND VERBRAUCHERSCHUTZ (Referat Tierschutz, 10.1.1997): Mindestanforderungen an die Haltung von Reptilien. Verfügbar unter: <http://www.bmelv.de/cae/servlet/contentblob/383050/publicationFile/22364/HaltungReptilien.pdf>.
- BÜTTNER, M. (2002): Allgemeine Virologie. In: ROLLE, M. und MAYR, A. (Hrsg.). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7. Auflage. Enke Verlag, Stuttgart, S. 65-144.
- CHATTON, E. und BLANC, G. (1914): Sur un hématozoaire nouveau, *Pirhemocytion tarentolae*, du gecko *Tarentola mauritanica*, et sur les altérations globulaires qu'il détermine. *Comptes Rendu de la Societe Biologie* **77**, 496-498.
- CHEN, Z.-X., ZHENG, J.-C. und JIANG, J.-L. (1999): A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle. *Virus Research* **63**, 147-151.
- CHINCHAR, V. G., METZGER, D. W., GRANOFF, A. und GOORHA, R. (1984): Localization of frog virus 3 proteins using monoclonal antibodies. *Virology* **137**, 211-216.
- CHINCHAR, V. G. (2002): Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded Killers. *Archives of Virology* **147**, 447-470.
- CHINCHAR, V. G., BRYAN, L., WANG, J., LONG, S. und CHINCHAR, G. D. (2003): Induction of apoptosis in frog virus 3-infected cells. *Virology* **306**, 303-312.
- CHINCHAR, V. G., ESSBAUER, S., HE, J. G., HYATT, A., MIYAZAKI, T., SELIGY, V. und WILLIAMS, T. (2005): Family *Iridoviridae*. In: FAUQUET, C. M., MAYO, M. A., MANILOFF, J., DESSELBERGER, U. und BALL, L. A. (Hrsg.). *Virus Taxonomy. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, Amsterdam, S. 145-162.
- COOPER, E. L., KLEMPAU, A. E. und ZAPATA, A. G. (1985): Reptilian immunity. In: GANS, C., BILLETT, F. S. und MADERSON, P. F. A. (Hrsg.). *Biology of the reptilia. Development A. Volume 14*. John Wiley and Sons, New York, S. 599-678.

- CULLEN, B. R., OWENS, L. und WHITTINGTON, R. J. (1995): Experimental infection of Australian anurans (*Limnodynastes terraereginae* and *Litoria latopalmata*) with Bohle iridovirus. *Diseases of Aquatic Organisms* **23**, 83-92.
- CUNNINGHAM, A. A., LANGTON, T. E. S., BENNETT, P. M., LEWIN, J. F., DRURY, S. E. N., GOUGH, R. E. und MACGREGOR, S. K. (1996): Pathological and microbiological findings from incidents of unusual mortality of the common frog (*Rana temporaria*). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **351**, 1539-1557.
- CUTLER, S. J. und WRIGHT, D. J. (1989): Comparison of immunofluorescence and enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosing Lyme disease. *Journal of Clinical Pathology* **42**, 869-871.
- DASZAK, P., BERGER, L., CUNNINGHAM, A. A., HYATT, A. D., GREEN, D. E. und SPEARE, R. (1999): Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Infectious Diseases* **5**, 735-748.
- DE VOE, R., GEISSLER, K., ELMORE, S., ROTSTEIN, D., LEWBART, G. und GUY, J. (2004): Ranavirus-associated morbidity and mortality in a group of captive eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **35**, 534-543.
- EISENBERG, T. (2003): Wie sollte eine fachgerechte Quarantäne durchgeführt werden? *Reptilia* **8**, 66-71.
- EITINGER, T. (2007): Prokaryontische Genetik und Molekularbiologie. In: FUCHS, G. (Hrsg.). *Allgemeine Mikrobiologie*. 8. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 439-491.
- ESSBAUER, S. und AHNE, W. (2001): Viruses of lower vertebrates. *Journal of Veterinary Medicine B* **48**, 403-475.
- FRITZ, U. und HAVES, P. (2007): Checklist of chelonians of the world. *Vertebrate Zoology* **57**, 149-368.
- GOORHA, R. und MURTI, K. G. (1982): The genom of frog virus 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **79**, 248-252.
- GRANOFF, A., CAME, P. E. und RAFFERTY, K. A. (1965): The isolation and properties of viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship to the renal adenocarcinoma of the leopard frog. *Annals of the New York Academy of Sciences* **126**, 237-255.
- GREEN, D. E., CONVERSE, K. A. und SCHRADER, A. K. (2002): Epizootiology of sixty-four amphibian morbidity and mortality events in the USA, 1996-2001. *Annals of the New York Academy of Sciences* **969**, 323-339.

- HAAS, R. und MAASS, G. (1964): Die Wirkung von 5-Jod-2-desoxyuridin auf die Vermehrung von SV-40 in Gewebekulturen. *Archives of Virology* **14**, 567-582.
- HARP, E. M. und PETRANKA, J. W. (2006): Ranavirus in wood frogs (*Rana sylvatica*): Potential sources of transmission within and between ponds. *Journal of Wildlife Diseases* **42**, 307-318.
- HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1982): Spontaneous viral hepatitis in a spur-tailed Mediterranean land tortoise (*Testudo hermanni*). *Journal of Zoo Animal Medicine* **13**, 113-120.
- HERNANDEZ-DIVERS, S. J. (2006): Diagnostic Techniques. In: MADER, D. R. (Hrsg.). *Reptile Medicine and Surgery*. 2. Edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, S. 490-532.
- HIRSCH-KAUFFMANN, M. und SCHWEIGER, M. (2006): *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. 6. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 333-354.
- HUANG, Y., HUANG, X., LIU, H., GONG, J., OUYANG, Z., CUI, H., CAO, J., ZHAO, J., WANG, X., JIANG, Y. und QIN, Q. (2009): Complete sequence determination of a novel reptile iridovirus isolated from soft-shelled turtle and evolutionary analysis of *Iridoviridae*. *Bio Med Central Genomics* **10**:224. Verfügbar unter: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/224/abstract>.
- HUNT, T. J. (1964): Anesthesia of the tortoise. In: GRAHAM-JONES, O. (Hrsg.). *Small Animal Anesthesia*. Pergamon Press, Oxford, S. 71-76.
- HYATT, A. D., GOULD, A. R., ZUPANOVIC, Z., CUNNINGHAM, A. A., HENGSTBERGER, S., WHITTINGTON, R. J., KATTENBELT, J. und COUPAR, B. E. H. (2000): Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses. *Archives of Virology* **145**, 301-331.
- HYATT, A. D., WILLIAMSON, M., COUPAR, B. E. H., MIDDLETON, D., HENGSTBERGER, S. G., GOULD, A. R., SELLECK, P., WISE, T. G., KATTENBELT, J., CUNNINGHAM, A. A. und LEE, J. (2002): First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *Journal of Wildlife Diseases* **38**, 239-252.
- JACOBSON, E. R., JOHNSON, A. J., HERNANDEZ, J. A., TUCKER, S. J., DUPUIS, A. P., STEVENS, R. C. und STARK, L. (2005): Validation and use of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to West Nile Virus in American alligators (*Alligator mississippiensis*) in Florida. *Journal of Wildlife Diseases* **41**, 107-114.
- JACOBSON, E. R. (2007): Viruses and viral diseases of reptiles. In: JACOBSON, E. R. (Hrsg.). *Infectious diseases and pathology of reptiles*. CRC Press, Boca Raton, S. 395-460.

- JOHNSRUDE, J. D., RASKIN, R. E., HOGE, A. Y. A. und ERDOS, G. W. (1997): Intraerythrocytic inclusions associated with iridoviral infection in a fer de lance (*Bothrops moojeni*) snake. *Veterinary Pathology* **34**, 235-238.
- JOHNSON, A. J., NORTON, T. M., WELLEHAN, J. F. X., PESSIER, A. P., SPRATT, J., STEDMAN, N. und JACOBSON, E. R. (2004): Iridovirus outbreak in captive Burmese star tortoises (*Geochelone platynota*). *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, S. 143.
- JOHNSON, A. J., PESSIER, A. P. und JACOBSON, E. R. (2007): Experimental transmission and induction of ranaviral disease in western ornate box turtles (*Terrapene ornata ornata*) and red eared sliders (*Trachemys scripta elegans*). *Veterinary Pathology* **44**, 285-297.
- JOHNSON, A. J., PESSIER, A. P., WELLEHAN, J. F. X., CHILDRESS, A., NORTON, T. M., STEDMAN, N. L., BLOMM, D. C., BELZER, W., TITUS, V. R., WAGNER, R., BROOKS, J. W., SPRATT, J. und JACOBSON, E. R. (2008): Ranavirus infection of free-ranging and captive box turtles and tortoises in the United States. *Journal of Wildlife Diseases* **44**, 851-863.
- JOHNSON, A. J. und JACOBSON, E. R. (2008): Detection of antibodies to ranavirus in gopher tortoises (*Gopherus polyphemus*) in the southeast united states. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians*, 74-75.
- JUST, F., ESSBAUER, S., AHNE, W. und BLAHAK, S. (2001): Occurrence of an invertebrate iridescent-like virus (*Iridoviridae*) in reptiles. *Journal of Veterinary Medicine B* **48**, 685-694.
- KLEY, A. (2003): Entwicklung und Anwendung eines Enzyme-Linked-Immuno-sorbent-Assay (ELISA) für die Erfassung der Campylobacter-Situation in Schweinebeständen mittels Blutserum- und Fleischsaftproben, Veterinärmedizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- LEE, M. H. und WILLIS, D. B. (1983): Restriction endonuklease mapping of the frog virus 3 genome. *Virology* **126**, 317-327.
- MANIERO, G. D., MORALES, H., GANTRESS, J. und ROBERT, J. (2006): Generation of a long-lasting, protective, and neutralizing antibody response to the ranavirus FV3 by the frog *Xenopus*. *Developmental and Comparative Immunology* **30**, 649-657.
- MAO, J., THAM, T. N., GENTRY, G. A., AUBERTIN, A. und CHINCHAR, V. G. (1996): Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of the iridovirus frog virus 3. *Virology* **216**, 431-436.

- MAO, J., HEDRICK, R. P. und CHINCHAR, V. G. (1997): Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology* **229**, 212-220.
- MAO, J., GREEN, D. E., FELLERS, G. und CHINCHAR, V. G. (1999): Molecular characterization of iridoviruses isolated from sympatric amphibians and fish. *Virus Research* **63**, 45-52.
- MARSCHANG, R. E., POSTHAUS, H., WILD, P., STERCHI, P., KALETA, E. F. und BACCIARINI, L. N. (1998): Isolation of an irido-like virus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). Proceedings of the European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians, 287-294.
- MARSCHANG, R. E., BECHER, P., POSTHAUS, H., WILD, P., THIEL, H.-J., MÜLLER-DOBLIES, U., KALETA, E. F. und BACCIARINI, L. N. (1999): Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). *Archives of Virology* **144**, 1909-1922.
- MARSCHANG, R.E., BECHER, P. und BRAUN, S. (2002): Isolation of iridoviruses from three different lizard species. Proceedings of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, 99-100.
- MARSCHANG, R. E. und CHITTY, J. (2004): Infectious diseases. In: GIERLING, S. J. und RAITI, P. (Hrsg.). BSAVA manual of reptiles. Second edition. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, S. 330-345.
- MARSCHANG, R. E., BRAUN, S. und BECHER, P. (2005): Isolation of a ranavirus from a gecko (*Uroplatus fimbriatus*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **36**, 295-300.
- MARSCHANG, R. E., PAPP, T., HOFFMANN, A., PRUVOST, N. B. und REYER, H. U. (2009): Nachweis von Ranaviren bei einer Gruppe *Rana esculenta* in der Schweiz, 1. DVG-Tagung über Vogel- und Reptilienkrankheiten, S. 82-84.
- MARQUARDT, W. C. und YAEGER, R. G. (1967): The structure and taxonomic status of *Toddia* from the cottonmouth snake *Agkistrodon piscivorus leucostoma*. *The Journal of Protozoology* **14**, 726-731.
- MAYR, A. und BÖGEL, K. (1961): Der Chloroform-Resistenztest zur Isolierung und Charakterisierung von Enteroviren. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung 1. Originale **182**, 564-570.
- MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1974): Virologische Arbeitsmethoden, Bd. I. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- MOODY, N. J. G. und OWENS, L. (1994): Experimental demonstration of the pathogenicity of a frog virus, Bohle iridovirus, for a fish species, barramundi *Lates calcarifer*. *Diseases of Aquatic Organisms* **18**, 95-102.
- MÜLLER, M., ZANGGER, N. und DENZLER, T. (1988): Iridovirus-Epidemie bei der griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni hermanni*). Verhandlungsbericht des Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere **30**, 271-274.
- Nicoloff, J. T. und Spencer C. A. (1990): Serum TSH measurement: A 1990 Status Report. *Thyroid Today* **13**, 1-12.
- NOELLE, R. J., ROY, M. und SHEPHERD, D. M. (1992): A novel ligand on activated helper T cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B-cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6550-6554.
- NUNC<sup>TM</sup> Brand Products (2001): Solid Phase Guide. Verfügbar unter: <http://www.fisher.co.uk/techzone/life/hints/nuncsolidphase.pdf>.
- OIE (2007): Aquatic animal disease cards: Infection with ranavirus. Verfügbar unter: [http://www.oie.int/aac/eng/Publicat/Cardsenglish/Ranavirus%20card\\_final.pdf](http://www.oie.int/aac/eng/Publicat/Cardsenglish/Ranavirus%20card_final.pdf).
- ORIGGI, F. C., KLEIN, P. A., MATHES, K., BLAHAK, S., MARSCHANG, R. E., TUCKER, S. J. und JACOBSON, E. R. (2001): Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting herpesvirus exposure in Mediterranean tortoises (spur-thighed tortoise [*Testudo graeca*] and Hermann's tortoise [*Testudo hermanni*]). *Journal of Clinical Microbiology* **39**, 3156-3163.
- ORIGGI, F. C. (2007): Reptile immunology. In: JACOBSON, E. R. (Hrsg.). *Infectious diseases and pathology of reptiles*. CRC Press, Boca Raton, S. 131-157.
- PANAGIONTA, M. und VALAKOS, E. D. (1992): Contribution to the thermal ecology of *testudo marginata* and *T. hermanni* (Chelonia: Testudinidea) in semi-captivity. *Herpetological Journal* **2**, 48-50.
- PASMANS, F., BLAHAK, S., MARTEL, A., PANTCHEV, N. und ZWART, P. (2008): *Ranavirus*-associated mass mortality in imported red tailed knobby newts (*Tylosotriton kweichowensis*): A case report. *The Veterinary Journal* **176**, 257-259.
- PASSARGE, E. und KOHLHASE, J. (2006): Genetik, Physiologische Grundlagen. In: SIEGENTHALER, W. und BLUM, H. E. (Hrsg.). *Klinische Pathophysiologie*. 9. Auflage. Thieme Verlag, Stuttgart, S. 2-25.
- PRUSOFF, W. H. (1960): Studies on the mechanism of action of 5-iododeoxyuridine, an analog of thymidine. *Cancer Research* **20**, 92-95.



- 
- ROBERT, J., MORALES, H., BUCK, W., COHEN, N., MARR, S. und GANTRESS, J. (2005): Histopathogenesis and immune responses to FV3 virus infection in *Xenopus*. *Virology* **332**, 667-675.
- ROBERT, J., ABRAMOWITZ, L., GANTRESS, J. und MORALES, H. D. (2007): *Xenopus laevis*: a possible vector of ranavirus infection? *Journal of Wildlife Diseases* **43**, 645-652.
- ROBERTS, R. J., BELFORD, M., BESTOR, T., BHAGWAT, A. S., BICKLE, T. A., BITINAITE, J., BLUMENTHAL, R. M., DEGTYAREV, S. K., DRYDEN, D. T. F., DYBVIK, K., FIRMAN, K., GROMOVA, E. S., GUMPORT, R. I., HALFORD, S. E., HATTMAN, S., HEITMAN, J., HORNBY, D. P., JANULAITIS, A., JELTSCH, A., JOSEPHSEN, J., KISS, A., KLAENHAMMER, T. R., KOBAYASHI, I., KONG, H., KRUEGER, D. H., LACKS, S., MARINUS, M. G., MIYAHARA, M., MORGAN, R. D., MURRAY, N. E., NAGARAJA, V., PIEKAROWICZ, A., PINGOUD, A., RALEIGH, E., RAO, D. N., REICH, N., REPIN, V. E., SELKER, E. U., SHAW, P.-C., SEIN, D. C., STODDARD, B. L., SZYBALSKI, W., TRAUTNER, T. A., VAN ETEN, J. L., VITOR, J. M. B., WILSON, G. G. und XU, S.-Y. (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases, and their genes. *Nucleic Acids Research* **31**, 1805-1812.
- ROJAS, S., RICHARDS, K., JANCOVICH, J. K. und DAVIDSON, E. W. (2005): Influence of temperature on ranavirus infection in larval salamanders *Ambystoma tigrinum*. *Diseases of Aquatic Organisms* **63**, 95-100.
- SANGER, F., NICKLEN, S. und COULSON, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- SASSENBERG, L. und ZWART, P. (2005): Schildkröten. In: FEHR, M., SASSENBERG, L. und ZWART, P. (Hrsg.). *Krankheiten der Heimtiere*. 6. Auflage. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover, S. 653-738.
- SCHIRA, J. (2005): *Statistische Methoden der VWL und BWL. Theorie und Praxis*. 2. Auflage. Pearson Studium, München.
- SMITH, H. O. und NATHANS, D. (1973): A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *Journal of Molecular Biology* **81**, 419-423.
- SPEARE, R. und SMITH, J. R. (1992): An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynastes ornatus* in northern Australia. *Diseases of Aquatic Organisms* **14**, 51-57.
- ST-AMOUR, V. und LESBARRÈRES, D. (2007): Genetic evidence of *ranavirus* in toe clips: an alternative to lethal sampling methods. *Conservation Genetics* **8**, 1247-1250.

- STEBBENS, W. E. und JOHNSTON, M. R. L. (1966): The viral nature of *Pirhemocytion tarentolae*. Journal of Ultrastructure Research **15**, 543-554.
- STREISINGER, G., EMRICH, J. und STAHL, M. M. (1967): Chromosome structure in phage T4. III. Terminal redundancy and length determination. Proceedings of the National Academy of Sciences **57**, 292-295.
- TAN, W. G. H., BARKMAN, T. J., CHINCHAR, V. G. und ESSANI, K. (2004): Comparative genomic analyses of frog virus 3, type species of the genus *Ranavirus* (family *Iridoviridae*). Virology **323**, 70-84.
- TELFORD, S. R., JR. und JACOBSON E. R. (1993): Lizard erythrocytic virus in east african chameleons. Journal of Wildlife Diseases **29**, 57-63.
- TIDONA, C. A., SCHNITZLER, P., KEHM, R. und DARAI, G. (1998): Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? Virus Genes **16**, 59-66.
- TORNEDE, C. (2006): Untersuchungen zur Differenzierung von Herpesviren bei Landschildkröten durch Restriktionsendonukleasen, Serumneutralisationstest und PCR, Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- VAN DEVANTER, D. R., WARRENER, P., BENNETT, L., SCHULTZ, E. R., COULTER, S., GARBER, R. L. und ROSE, T. M. (1996): Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. Journal of Clinical Microbiology **34**, 1666-1671.
- WEBER, T., TREBST, C., FRYE, S., CINQUE, P., VAGO, L., SINDIC, C. J., SCHULZ SCHAEFFER, W. J., KRETZSCHMAR, H. A., ENZENSBERGER, W., HUNSMANN, G. und LUKE, W. (1997): Analysis of the systemic and intrathecal humoral immune response in progressive multifocal leukoencephalopathy. The Journal of Infectious Diseases **176**, 250-254.
- WEINMANN, N. (2007): Übertragung eines Iridovirus aus einem Helmchamäleon (*Chamaeleo hoehnelii*) auf Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* und Versuch zur Infektion von Bartagamen (*Pogona vitticeps*) mit Iridovirus-infizierten Grillen. Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.
- WESTHAUSE, R. A., JACOBSON, E. R., HARRIS, R. K., WINTER, K. R. und HOMER, B. L. (1996): Respiratory and pharyngo-esophageal iridovirus infection in a gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). Journal of Wildlife Diseases **32**, 682-686.

- 
- WHITTINGTON, R. J. und REDDACLIFF, G. L. (1995): Influence of environmental temperature on experimental infection of redbfin perch (*Perca fluviatilis*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Australian Veterinary Journal* **72**, 421-424.
- WIECHERT, J. (2000): Die mediterrane Landschildkröte in der tierärztlichen Praxis. *Draco* **1**, 60-69.
- WILLIAMS, T. (1996): The iridoviruses. *Advances in Virus Research* **46**, 345-412.
- ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L. und MILLER, W. (2000): A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology* **7**, 203-214.
- ZHAO, Z., TENG, Y., LIU, X., WANG, K., JIANG, Y. und CHEN, H. (2007): Charakterization of a late gene encoding for MCP in soft shelled turtle iridovirus (STIV). *Virus Research* **129**, 135-144.
- ZUPANOVIC, Z., LOPEZ, G., HYATT, A. D., GREEN, B., BARTRAN, G., PARKES, H., WHITTINGTON, R. J. und SPEARE, R. (1998a): Giant toads *Bufo marinus* in Australia and Venezuela have antibodies against 'ranaviruses'. *Diseases of Aquatic Organisms* **32**, 1-8.
- ZUPANOVIC, Z., LOPEZ, G., HYATT, A., SHIELL, B. J. und ROBINSON, A. J. (1998b): An improved enzyme-linked immunosorbent assay for detection of anti-ranavirus antibodies in the serum of the giant toad (*Bufo marinus*). *Developmental and Comparative Immunology* **22**, 573-585.

## 9 ANHANG

**Tabelle 36:** Angaben zu den Seren von Schildkröten aus Ranavirus-infizierten Beständen

Serumnummer	Spezies	Tag der Blutentnahme	Gesundheitsstatus bzgl. einer Infektion mit Ranavirus	Bezeichnung des Tieres
F1.1	<i>T. marginata</i>	17.12.07	erkrankt	„Mara“
F2.1	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.1	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.2	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.3	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.4	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.5	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.6	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.7	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.8	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.9	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.10	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.11	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.12	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.13	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.14	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.15	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.16	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.17	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
B1.18	<i>T. hermanni</i>	18.12.07	erkrankt	
F3.1	<i>T. hermanni</i>	22.12.07	erkrankt	
F3.2	<i>T. hermanni</i>	22.12.07	erkrankt	=CU10/08
F3.3	<i>T. hermanni</i>	22.12.07	erkrankt	=CU8/08
F3.4	<i>T. hermanni</i>	22.12.07	erkrankt	=CU12/08
F3.5	<i>T. hermanni</i>	22.12.07	erkrankt	=CU11/08
F3.6	<i>T. hermanni</i>	22.12.07	erkrankt	=CU9/08
F3.7	<i>T. hermanni</i>	22.12.07	erkrankt	=CU13/08

F4.1	<i>T. hermanni</i>	18.2.08	Kontakt	
F5.1	<i>T. hermanni</i>	24.2.08	Kontakt	
B2.1	<i>T. hermanni</i>	27.2.08	Kontakt	
B2.2	<i>T. hermanni</i>	27.2.08	Kontakt	
M1.1	<i>T. hermanni</i>	18.7.08	genesen	„Minni“
M1.2	<i>T. hermanni</i>	18.7.08	genesen	„Fips“
E1.1	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.2	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.3	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.4	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.5	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.6	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.7	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.8	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.9	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.10	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.11	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.12	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.13	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E1.14	<i>T. hermanni</i>	24.7.08	Kontakt	
E2.1	<i>T. hermanni</i>	23.9.08	genesen	
E2.2	<i>T. hermanni</i>	23.9.08	genesen	
E2.3	<i>T. marginata</i>	23.9.08	genesen	
E3.1	<i>T. graeca</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.2	<i>T. graeca</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.3	<i>T. marginata</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.4	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.5	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.6	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.7	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.8	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.9	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.10	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	

E3.11	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.12	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.13	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	unauffällig	
E3.14	<i>T. carolina</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.15	<i>T. carolina</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.16	<i>T. carolina</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.17	<i>T. carolina</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.18	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.19	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.20	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.21	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.22	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.23	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.24	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.25	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.26	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.27	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.28	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.29	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.30	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.31	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.32	<i>T. marginata</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.33	<i>T. graeca</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.34	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.35	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.36	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	Kontakt	
E3.37	<i>T. marginata</i>	9.7.09	genesen	
E3.38	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	genesen	
E3.39	<i>T. hermanni</i>	9.7.09	genesen	
E3.40	<i>G. sulcata</i>	9.7.09	Kontakt	
H1.1	<i>T. hermanni</i>	12.7.09	unauffällig	
H2.1	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.2	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	

H2.3	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.4	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.5	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.6	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.7	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.8	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.9	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.10	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.11	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.12	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.13	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.14	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.15	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.16	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.17	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	=H1.1
H2.18	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	genesen	=E3.38
H2.19	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	genesen	=E3.39
H2.20	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
H2.21	<i>T. hermanni</i>	20.9.09	unauffällig	
E4.1	<i>T. marginata</i>	20.9.09	Kontakt	=E3.32
E4.2	<i>T. graeca</i>	20.9.09	unauffällig	=E3.2
E4.3	<i>T. graeca</i>	20.9.09	Kontakt	=E3.33
M2.1	<i>T. hermanni</i>	25.11.09	genesen	„Minni“
M2.2	<i>T. hermanni</i>	25.11.09	genesen	„Fips“
M2.3	<i>T. hermanni</i>	25.11.09	Kontakt	„Möppi“
M2.4	<i>T. hermanni</i>	25.11.09	Kontakt	„Maja“
M2.5	<i>T. hermanni</i>	25.11.09	Kontakt	„Sternchen“
M2.6	<i>T. hermanni</i>	25.11.09	Kontakt	„Püktchen“
M2.7	<i>T. hermanni</i>	25.11.09	Kontakt	„Kiara“
G1	<i>T. hermanni</i>	12.5.09	genesen	„Gertrude“
G2	<i>T. hermanni</i>	30.6.09	genesen	„Gertrude“
A1	<i>T. hermanni</i>	30.6.09	genesen	„Agatha“
K1	<i>T. hermanni</i>	30.6.09	genesen	„Klaus“

G3	<i>T. hermanni</i>	3.9.09	genesen	„Gertrude“
A2	<i>T. hermanni</i>	3.9.09	genesen	„Agatha“
K2	<i>T. hermanni</i>	3.9.09	genesen	„Klaus“
G4	<i>T. hermanni</i>	15.10.09	genesen	„Gertrude“
A3	<i>T. hermanni</i>	15.10.09	genesen	„Agatha“
K3	<i>T. hermanni</i>	15.10.09	genesen	„Klaus“

**Tabelle 37:** Angaben zu den Seren von Schildkröten aus Beständen ohne nachgewiesene Rana-virus-bedingte Erkrankungen

Negativ entspricht einem Neutralisationstiter < 1:2

Fraglich entspricht einem Neutralisationstiter zwischen 1:2 und < 1:8

Positiv entspricht einem Neutralisationstiter von mind. 1:8

Serum- nummer	Spezies	Ergebnis des NT mit Herpesvirus	
		770/95	1432/94
812	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
813	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
814	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
815	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
817	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
818	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
819	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
820	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
821	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
822	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
823	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
824	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
827	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
828	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
829	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
1103	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1104	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1105	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ



---

1106	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1107	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1108	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1109	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1110	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1111	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1112	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1114	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1115	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1116	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1117	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1118	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1119	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1120	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1182	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1805	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1813	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1839	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1857	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1861	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1869	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1918	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1922	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1961	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
1967	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1970	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1971	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1979	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1994	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
1995	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2027	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2028	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2029	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ

2031	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2032	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2033	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2034	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2035	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2055	<i>I. elongata</i>	negativ	negativ
2065	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2066	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2070	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2076	<i>I. elongata</i>	negativ	negativ
2082	<i>I. elongata</i>	negativ	negativ
2090	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2099	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2100	<i>I. elongata</i>	negativ	negativ
2107	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2118	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2131	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2132	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2133	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2134	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2135	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2136	<i>T. graeca</i>	fraglich (1:6)	<b>positiv (1:8)</b>
2137	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2139	<i>T. hermanni</i>	fraglich	negativ
2147	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2156	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2166	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2167	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2180	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2181	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2182	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2183	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2190	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ

2195	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2196	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2197	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2198	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2199	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2202	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2203	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2232	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2259	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2260	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2263	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2290	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2291	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2293	<i>T. hermanni</i>	negativ	negativ
2306	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2307	<i>T. graeca</i>	negativ	negativ
2365	<i>T. hermanni</i>	<b>positiv (1:16)</b>	fraglich (1:4)
2367	<i>T. hermanni</i>	negativ	<b>positiv (1:16)</b>
2504	<i>T. graeca</i>	<b>positiv (1:16)</b>	fraglich (1:6)
2505	<i>T. graeca</i>	<b>positiv (1:10)</b>	negativ
2507	<i>T. graeca</i>	<b>positiv (1:16)</b>	<b>positiv (1:10)</b>
2614	<i>T. hermanni</i>	negativ	<b>positiv (1:128)</b>







FV-3	100										
1834	33	100									
354	33	100	100								
4152	33	100	100	100							
5187	33	100	100	100	100						
5810	33	100	100	100	100	100					
CU10	33	100	100	100	100	100	100				
6172	33	100	100	100	100	100	100	100			
CU60	33	100	100	100	100	100	100	100	100		
882	33	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	FV-3	1834	354	4152	5187	5810	CU10	6172	CU60	882	

**Abbildung 24:** Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit **EcoRI**

FV-3	100										
1834	44	100									
354	22	11	100								
4152	22	11	100	100							
5187	22	11	100	100	100						
5810	22	11	100	100	100	100					
CU10	22	11	100	100	100	100	100				
6172	22	11	100	100	100	100	100	100			
CU60	22	11	100	100	100	100	100	100	100		
882	22	11	60	60	60	60	60	60	60	100	
	FV-3	1834	354	4152	5187	5810	CU10	6172	CU60	882	

**Abbildung 25:** Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit **HindIII**

FV-3	100										
1834	32	100									
354	13	5	100								
4152	13	5	100	100							
5187	13	5	100	100	100						
5810	13	5	100	100	100	100					
CU10	13	5	100	100	100	100	100				
6172	13	5	85	85	85	85	85	100			
CU60	13	5	100	100	100	100	100	85	100		
882	14	5	92	92	92	92	92	77	92	100	
	FV-3	1834	354	4152	5187	5810	CU10	6172	CU60	882	

**Abbildung 26:** Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit **Xbal**

FV-3	100										
1834	42	100									
354	21	12	100								
4152	21	12	100	100							
5187	21	12	100	100	100						
5810	21	12	100	100	100	100					
CU10	21	12	100	100	100	100	100				
6172	21	12	100	100	100	100	100	100			
CU60	21	12	100	100	100	100	100	100	100		
882	32	17	72	72	72	72	72	72	72	100	
	FV-3	1834	354	4152	5187	5810	CU10	6172	CU60	882	

**Abbildung 27:** Prozentuale Übereinstimmung der Bandenmuster nach Spaltung mit **Kpnl**



**Table 42:** Ergebnisse (ELISA-Werte) aller 227 mittels ELISA (Ranavirus 882/96) untersuchten Seren

Serumnummer	Serumverdünnung	
	1:10	1:100
F2.1	1,07	1,05
B1.1	1,07	1,11
B1.2	1,12	1,07
B1.3	1,09	1,09
B1.4	1,15	1,07
B1.5	1,15	0,87
B1.6	1,18	0,99
B1.7	1,11	1,11
B1.8	1,07	1,05
B1.9	1,17	1,08
B1.10	1,11	1,04
B1.11	1,09	1,04
B1.12	1,23	1,07
B1.13	1,40	1,14
B1.14	1,18	0,99
B1.15	1,10	1,11
B1.16	1,15	1,14
B1.17	1,02	1,08
B1.18	1,07	1,10
F3.1	1,04	1,13
F3.2	1,09	1,11
F3.3	1,11	1,17
F3.4	1,10	1,14
F3.5	1,13	1,08
F3.6	1,00	1,17
F3.7	1,18	1,05
F4.1	1,08	1,18
F5.1	1,01	0,97

Serumnummer	Serumverdünnung	
	1:10	1:100
B2.1	1,28	1,18
B2.2	1,16	1,02
M1.1	9,92	2,48
M1.2	4,38	1,35
E1.1	1,09	1,23
E1.2	1,19	1,04
E1.3	1,15	1,16
E1.4	1,13	1,02
E1.5	1,17	0,96
E1.6	1,10	1,08
E1.7	1,29	1,32
E1.8	1,23	1,05
E1.9	1,00	1,06
E1.10	1,13	1,08
E1.11	1,11	1,13
E1.12	1,15	1,17
E1.13	1,13	1,06
E1.14	1,07	1,03
E2.1	2,26	1,80
E2.2	0,98	1,13
E3.1	1,33	1,15
E3.2	2,00	1,26
E3.4	1,10	1,15
E3.5	1,07	1,10
E3.6	1,14	1,12
E3.7	1,11	1,13
E3.8	0,99	1,08
E3.9	1,16	1,16

E3.10	1,13	1,16
E3.11	1,19	1,07
E3.12	1,16	1,21
E3.13	1,10	1,08
E3.18	1,08	1,13
E3.19	1,08	1,12
E3.20	1,03	1,10
E3.21	1,03	0,98
E3.22	1,05	1,00
E3.23	1,27	1,04
E3.24	1,15	1,13
E3.25	1,32	1,06
E3.26	1,14	1,11
E3.27	0,82	0,87
E3.28	0,89	0,77
E3.29	0,89	0,84
E3.30	0,97	0,86
E3.31	1,18	1,08
E3.33	1,05	1,03
E3.34	1,10	1,03
E3.35	1,18	1,18
E3.36	1,04	1,04
E3.38	1,26	1,00
E3.39	23,20	9,11
H1.1	1,07	1,13
H2.1	1,25	0,87
H2.2	1,06	1,04
H2.3	1,22	1,09
H2.4	1,04	1,00
H2.5	1,05	0,94
H2.6	1,23	1,01
H2.7	1,99	1,09
H2.8	1,12	0,99

H2.9	1,02	1,01
H2.10	1,24	1,11
H2.11	1,09	1,00
H2.12	0,88	1,00
H2.13	0,98	0,98
H2.14	1,19	1,01
H2.15	1,09	0,92
H2.16	1,36	1,03
H2.17	1,10	0,98
H2.18	8,35	2,58
H2.19	30,23	11,90
H2.20	1,04	0,95
H2.21	1,05	1,00
E4.2	2,16	1,06
E4.3	1,02	1,04
M2.1	37,94	18,97
M2.2	12,71	3,43
M2.3	1,25	1,15
M2.4	1,07	1,14
M2.5	1,19	1,10
M2.6	1,14	1,09
M2.7	1,07	1,34
G1	12,69	4,88
G2	23,89	8,39
A1	2,05	1,14
K1	6,06	2,42
G3	28,10	12,04
A2	11,07	3,48
K2	18,97	5,57
G4	29,00	14,35
A3	15,21	4,52
K3	21,55	7,49
812	0,91	0,81

813	0,88	1,00
814	1,02	0,89
815	1,14	0,90
817	1,17	1,12
818	1,24	1,14
819	1,37	1,26
820	1,44	1,11
821	1,01	1,16
822	1,26	1,13
823	0,89	0,94
824	0,72	1,09
827	1,06	1,05
828	1,06	0,87
829	1,00	1,03
1103	1,26	0,92
1104	1,16	1,09
1105	1,11	1,06
1106	1,06	1,03
1107	1,07	1,00
1108	1,09	1,20
1109	1,04	1,04
1110	0,98	1,06
1111	0,98	0,94
1112	1,00	1,13
1114	1,15	0,83
1115	1,12	0,93
1116	1,09	0,81
1117	0,95	0,98
1118	1,08	0,95
1119	1,00	0,97
1120	1,27	1,09
1182	1,02	0,96
1805	1,09	0,96

1813	1,17	1,12
1839	1,04	1,00
1857	1,18	1,00
1861	1,10	1,04
1869	1,16	0,97
1918	0,99	1,02
1922	1,06	1,13
1961	0,96	0,96
1967	1,05	1,21
1970	1,08	1,02
1971	1,04	1,26
1979	1,41	1,12
1994	1,14	1,00
1995	1,03	0,98
2027	1,20	1,06
2028	1,13	0,97
2029	1,15	1,10
2031	1,18	1,10
2032	1,12	1,11
2033	1,25	1,08
2034	1,22	1,19
2035	1,25	1,15
2055	1,10	1,12
2065	1,06	1,12
2066	1,34	1,19
2070	1,08	1,12
2076	1,02	1,00
2082	0,89	1,07
2090	1,19	1,08
2099	1,12	1,03
2100	1,05	1,03
2107	1,09	1,11
2118	1,19	1,14

2131	1,09	1,09
2132	0,83	1,10
2133	1,12	1,08
2134	1,17	1,09
2135	0,97	1,07
2136	1,09	1,12
2137	1,16	1,11
2139	1,10	1,08
2147	1,21	1,18
2156	1,14	1,05
2166	1,12	1,08
2167	0,97	0,96
2180	0,89	1,21
2181	1,04	1,09
2182	1,08	1,22
2183	1,09	0,91
2190	1,18	1,34
2195	1,01	1,07
2196	1,13	1,17
2197	1,08	0,99
2198	1,24	1,15
2199	1,30	1,14
2202	1,25	1,04
2203	1,19	0,97
2232	1,00	0,98
2259	1,13	1,38
2260	1,21	1,27
2263	1,42	1,24
2290	1,22	1,11
2291	1,01	1,07
2293	1,03	1,20
2306	1,38	1,17
2307	1,24	1,10

2365	1,12	1,25
2367	1,07	1,26
2504	1,11	0,99
2505	1,09	1,15
2507	1,01	0,97
2614	1,08	1,04

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Detmold, den 02.10.2010

Christine Uhlenbrok

## **Danksagungen**

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. E. F. Kaleta für die Überlassung des Themas und für seine immer zügigen Hilfestellungen und Korrekturvorschläge.

Ebenfalls bedanke ich mich herzlich bei Frau Dr. S. Blahak für die Betreuung dieser Arbeit und die Einführung in die Reptilienvirologie. Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeitern des Chemischen und Veterinäruntersuchungsamtes Ostwestfalen-Lippe für die Bereitstellung des Laborplatzes und der Arbeitsmaterialien. Allen Mitarbeitern, die mir die vielen Geräte und Arbeitsmethoden näher gebracht haben, sei herzlich gedankt. Auch für das fröhliche und aufmunternde Arbeitsklima möchte ich mich, vor allem bei den Mitarbeitern der Virologie, bedanken.

Mein Dank gilt ebenfalls allen Schildkrötenhaltern, die durch das Bereitstellen von Proben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, ohne deren Unterstützung sowohl das Studium als auch die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Zum Schluss danke ich meinem Freund Kai. Dafür, dass er immer für mich da ist und mich so nimmt, wie ich bin.



**ISBN 978-3-86345-014-4**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**  
**35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375**  
**e-mail: [info@dvg.net](mailto:info@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.de>**