

**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**

NADINE WEINMANN

INAUGURAL-DISSERTATION

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

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus der „Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
der Justus-Liebig-Universität Gießen“

Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

und

dem „Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim“

Betreuer: Prof. Dr. R. Böhm

**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**

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

eingereicht von

Nadine Weinmann

Tierärztin aus Karlsruhe

Gießen 2007

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. E. F. Kaleta

Prof. Dr. R. Böhm

Tag der Disputation: 07.09.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	Familie <i>Iridoviridae</i>	3
2.1.1	Genus <i>Iridovirus</i>	5
2.1.2	Genus <i>Chloriridovirus</i>	6
2.1.3	Genus <i>Ranavirus</i>	6
2.1.4	Genus <i>Lymphocystivirus</i>	7
2.1.5	Genus <i>Megalocytivirus</i>	7
2.1.6	Noch nicht einem Genus der Familie <i>Iridoviridae</i> zugeordnete Viren.....	8
2.2	Iridoviren bei Grillen	9
2.3	Iridoviren bei Reptilien.....	13
2.3.1	Histologische Nachweise von Iridoviren bei Schildkröten	13
2.3.2	Erythrocytic Necrosis Viren bei Reptilien	14
2.3.3	Ranavirusisolate aus Reptilien.....	15
2.3.4	Noch nicht einem Genus der Familie <i>Iridoviridae</i> zugeordnete Isolate aus Chamäleons.....	18
2.3.5	Invertebraten-Iridoviren aus Echsen	19
2.3.6	Bisherige Kenntnisse über das Isolat 100/01	20
2.4	Fragestellungen der eigenen Untersuchungen	21
3	MATERIAL UND METHODEN.....	22
3.1	Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien.....	22
3.1.1	Virologische Untersuchungen	22
3.1.2	Histologische Untersuchungen	26
3.1.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	27
3.1.4	Sonstige Untersuchungen.....	30
3.2	Eingesetzte Zelllinien	30
3.3	Weitere Materialien und Geräte	31
3.3.1	Virologische Untersuchungen	31
3.3.2	Histologische Untersuchungen	32
3.3.3	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	33

3.3.4	Versuche	34
3.4	Untersuchung der Proben	34
3.4.1	Virologische Untersuchungsmethoden.....	34
3.4.1.1	Zellkulturen.....	34
3.4.1.2	Virustitration	36
3.4.1.3	DNA-Präparation	36
3.4.1.4	PCR.....	37
3.4.1.5	Gelelektrophorese	41
3.4.1.6	Sequenzierung	41
3.4.2	In-situ-Hybridisierung (ISH)	42
3.5	Untersuchte Proben	42
3.6	Proben aus der Routinediagnostik	43
3.7	Übertragungsversuche	45
3.7.1	<i>Gryllus bimaculatus</i> (Zweifleckgrillen)	45
3.7.1.1	Etablierung einer IIV-freien Grillenzucht der Spezies <i>Gryllus bimaculatus</i>	47
3.7.1.2	Infektion von <i>Gryllus bimaculatus</i> mit einem IIV-artigen Virus aus einem <i>Chamaeleo hoehnelii</i> (Helmchamäleon).....	48
3.7.1.3	Infektion von <i>Gryllus bimaculatus</i> für den Übertragungsversuch mit <i>Pogona vitticeps</i>	50
3.7.2	<i>Pogona vitticeps</i> (Bartagamen)	51
3.7.2.1	Herkunft der im Übertragungsversuch eingesetzten <i>Pogona vitticeps</i>	52
3.7.2.2	Voruntersuchungen an den jungen <i>Pogona vitticeps</i>	53
3.7.2.2.1	Untersuchung von Kotproben im Flotationsverfahren	54
3.7.2.3	Infektionsversuch mit <i>Pogona vitticeps</i>	55
3.7.2.3.1	Blutentnahme bei <i>Pogona vitticeps</i>	58
3.7.2.4	Untersuchungen bei der Reservegruppe der Spezies <i>Pogona vitticeps</i>	59
3.7.2.5	Weitere virologische Untersuchungen beim Züchter	59
3.8	Probenkollektion und -aufbereitung.....	61

3.8.1	Probenkollektion und -aufbereitung für virologische Untersuchungen	61
3.8.2	Probenkollektion und -aufbereitung für histologische Untersuchungen	62
3.8.3	Probenkollektion und -aufbereitung für elektronenmikroskopische Untersuchungen.....	63
3.8.3.1	EM Untersuchungen von Organproben.....	64
3.8.3.2	EM Untersuchungen von Zellkulturüberstand	64
4	ERGEBNISSE.....	65
4.1	Proben aus der Routinediagnostik	65
4.2	Entwicklung der nested PCR	68
4.3	Infektionsversuche mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	72
4.3.1	Infektionsversuch I mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	72
4.3.2	Infektionsversuch II mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	78
4.3.3	Infektionsversuch III mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	84
4.3.4	Gesamtauswertung der Infektionsversuche I bis III mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	90
4.3.5	Infektionsversuch IV mit <i>Gryllus bimaculatus</i> für den Übertragungsversuch mit <i>Pogona vitticeps</i>	99
4.4	<i>Pogona vitticeps</i>	100
4.4.1	Untersuchungen der Elterntiere der <i>Pogona vitticeps</i> bei Bezug der Eier	100
4.4.2	Untersuchungen der <i>Pogona vitticeps</i> vor Versuchsbeginn.....	100
4.4.3	Infektionsversuch mit <i>Pogona vitticeps</i>	101
4.4.3.1	Organproben.....	103
4.4.3.2	Tupferproben	107
4.4.4	Untersuchungen bei zwei <i>Pogona vitticeps</i> der Reservegruppe	109
4.4.5	Weitere Untersuchungen bei den Eltern der <i>Pogona vitticeps</i> des Infektionsversuches.....	110
4.4.6	Gelege 2005 von den Elterntieren der <i>Pogona vitticeps</i> des Infektionsversuches	112

5	DISKUSSION	113
5.1	IIV bei Invertebraten aus Futtertierzuchten	113
5.2	Bedeutung von IIV bei Reptilien	119
5.2.1	Mögliche Übertragungswege von IIV auf Echsen.....	119
5.3	Proben aus der Routinediagnostik	120
5.4	Übertragungsversuche mit dem Isolat 100/01 auf Echsen der Spezies <i>Pogona vitticeps</i>	122
5.5	Pathogenität von IIV für Echsen.....	125
5.5.1	Einfluss des Alters der Tiere	126
5.5.2	Einfluss der Temperatur	127
5.6	Nachweismethoden.....	128
5.7	Empfehlungen für die Diagnostik im Labor.....	129
5.8	Empfehlungen für die Praxis	130
5.9	Empfohlene weiterführende Untersuchungen	131
6	ZUSAMMENFASSUNG	132
7	SUMMARY	135
8	LITERATURVERZEICHNIS	138
9	ANHANG.....	148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Männliche (links) und weibliche (rechts) <i>Gryllus bimaculatus</i> aus eigener Zucht	46
Abbildung 2: Männliche <i>Pogona vitticeps</i>	51
Abbildung 3: Nested PCR einer Titrationsreihe der 8. Passage auf TH-1 von Isolat 100/01; 1 µl als Template eingesetzt	69
Abbildung 4: Nested PCR einer Titrationsreihe der 8. Passage auf TH-1 von Isolat 100/01; 5 µl als Template eingesetzt	70
Abbildung 5: Temperaturverlauf des Infektionsversuches I mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	73
Abbildung 6: Temperaturverlauf des Infektionsversuches II mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	79
Abbildung 7: Temperaturverlauf des Infektionsversuches III mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	85
Abbildung 8: Bläuliche Irideszenz einer infizierten Grille (IV GB 22 IT) links; rechts Negativkontrolle	91
Abbildung 9: Unveränderte konfluente TH-1-Zellkultur. Nativpräparat. 100x	92
Abbildung 10: Iridovirus-Isolat IV GB 20 IT CPE in TH-1-Zellkultur 1 Tag p.i.. Nativpräparat. 100x	92
Abbildung 11: Unveränderte konfluente VH2-Zellkultur. Nativpräparat. 100x	93
Abbildung 12: Iridovirus-Isolat IV GB 20 IT CPE in VH2-Zellkultur 1 Tag p.i.. Nativpräparat. 100x	93
Abbildung 13: Nested PCR der infizierten Gruppe <i>Gryllus bimaculatus</i> Infektionsversuch I.....	94
Abbildung 14: Histologischer Schnitt Fettkörper <i>Gryllus bimaculatus</i> II GB 02 KT. HE. Originalvergrößerung x 40x.....	96
Abbildung 15: Histologischer Schnitt Fettkörper <i>Gryllus bimaculatus</i> II GB 10 IT. HE. Originalvergrößerung x 40x.....	96
Abbildung 16: Deutliche Signale (←) bei der In-situ-Hybridisierung im Fettkörper einer infizierten <i>Gryllus bimaculatus</i>	97
Abbildung 17: Elektronenmikroskopisches Bild des Fettkörpers von Grille III GB 20 IT: Assembly site. 8000x	98
Abbildung 18: Nested PCR von <i>Pogona vitticeps</i> PV 02 IT = erstes infiziertes Tier	104
Abbildung 19: Nested PCR von <i>Pogona vitticeps</i> PV 08 IT = fünftes infiziertes Tier	105
Abbildung 20: Nested PCR der Tupfer II vom 09.03.2005 <i>Pogona vitticeps</i>	108
Abbildung 21: Nested PCR von <i>Pogona vitticeps</i> PV 01 KTR = erstes Tier aus der Reservegruppe	110
Abbildung 22: Nested PCR der ersten Tupfer aus 2005 von den Elterntieren des Geleges II	111
Abbildung 23: Temperaturverlauf des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i>	150

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Genera der Familie <i>Iridoviridae</i>	5
Tabelle 2: BME Probenmedium	23
Tabelle 3: BME Anzuchtmedium	23
Tabelle 4: BME Erhaltungsmedium	23
Tabelle 5: DMEM Anzuchtmedium	24
Tabelle 6: DMEM Erhaltungsmedium	24
Tabelle 7: Medium für Insektenzellen	24
Tabelle 8: Primer der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001)	37
Tabelle 9: Protokoll des Mastermix für die PCR nach JUST und ESSBAUER (2001)	37
Tabelle 10: Temperaturprotokoll nach JUST und ESSBAUER (2001)	38
Tabelle 11: Primer der nested PCR	39
Tabelle 12: Protokoll des Mastermix für die 1. Runde der nested PCR	39
Tabelle 13: Protokoll des Mastermix für die 2. Runde der nested PCR	39
Tabelle 14: Temperaturprotokoll für die nested PCR	40
Tabelle 15: Im Infektionsversuch eingesetzte <i>Pogona vitticeps</i> (Infektionsbeginn 03.03.2005)	56
Tabelle 16: Ergebnisse der Untersuchungen der Bartagamenproben aus der Routinediagnostik	68
Tabelle 17: Ergebnisse der nested PCR mit der achten Passage der Titrationsreihe von 100/01	70
Tabelle 18: Ergebnisse der nested PCR mit der siebten Passage der Titrationsreihe von 100/01	71
Tabelle 19: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches I mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	72
Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse des Infektionsversuches I mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	76
Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden des Infektionsversuches I mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	77
Tabelle 22: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches II mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	78
Tabelle 23: Übersicht der Ergebnisse des Infektionsversuches II mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	82
Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden des Infektionsversuches II mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	83
Tabelle 25: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches III mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	84
Tabelle 26: Übersicht der Ergebnisse des Infektionsversuches III mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	88
Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden des Infektionsversuches III mit <i>Gryllus bimaculatus</i>	89
Tabelle 28: Temperatúrauswertung <i>Gryllus bimaculatus</i> Infektionsversuch IV	99

Tabelle 29: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i>	101
Tabelle 30: Anzahl der positiven Tiere für die verschiedenen Organe der <i>Pogona vitticeps</i> des Infektionsversuches	103
Tabelle 31: Übersicht der Tupferproben der <i>Pogona vitticeps</i> des Infektionsversuches	107
Tabelle 32: Ergebnisse der nested PCR des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i>	148
Tabelle 33: Ergebnisse der Elektronenmikroskopie und der In-situ-Hybridisierung Infektionsversuch mit <i>Pogona vitticeps</i>	149
Tabelle 34: Ergebnisse der nested PCR der Tupferproben von den Negativkontrolltieren des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i> ; Infektionsbeginn 03.03.2005	151
Tabelle 35: Ergebnisse der nested PCR der Tupferproben von den infizierten Tieren des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i> ; Infektionsbeginn 03.03.2005	152
Tabelle 36: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf TH-1 von den Negativkontrolltieren des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i> ; Infektionsbeginn 03.03.2005	153
Tabelle 37: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf TH-1 von den infizierten Tieren des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i> ; Infektionsbeginn 03.03.2005	154
Tabelle 38: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf VH2 von den Negativkontrolltieren des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i> ; Infektionsbeginn 03.03.2005	155
Tabelle 39: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf VH2 von den infizierten Tieren des Infektionsversuches mit <i>Pogona vitticeps</i> ; Infektionsbeginn 03.03.2005	156
Tabelle 40: Ergebnisse der virologischen Untersuchungen der Tupferproben von den Elterntieren (II), der im Infektionsversuch eingesetzten <i>Pogona vitticeps</i>	157
Tabelle 41: Statistische Berechnung der Wirksamkeit der Infektion (Infektionsversuche mit <i>Gryllus bimaculatus</i>) mit dem χ^2 -Test	158
Tabelle 42: Statistischer Vergleich der drei Infektionsversuche mit <i>Gryllus bimaculatus</i> mit dem χ^2 -Test	158
Tabelle 43: Statistischer Vergleich der Abhängigkeit der Untersuchungsmethoden (Infektionsversuche mit <i>Gryllus bimaculatus</i>) mit dem χ^2 -Test	159
Tabelle 44: Statistische Berechnung (Infektionsversuche mit <i>Gryllus bimaculatus</i>) nach dem McNemar Test	160

Abkürzungsverzeichnis

AG	Aktiengesellschaft
ASPV	Virus der afrikanischen Schweinepest
ATCC	American Type Culture Collection
BBA	Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft
BDMA	N-Benzyl dimethylamine
BME	Basal Medium Eagle´s
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CF-124	Zelllinie von <i>Choristoneura fumiferana</i>
cm ²	Quadratcentimeter
CPE	zytopathischer Effekt
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CrIV	Cricket Iridovirus
°C	Grad Celsius
DDSA	Dibutyl Pthalate
DIG	Digoxigenin-dUTP
DMEM	Dulbecco´s modified Eagle´s Medium
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
Dr.	Doktor
Dr. med. vet.	Doctor medicinae veterinariae
Dr. rer. nat.	Doctor rerum naturalium
DVM	Doctor of Veterinary Medicine
d.h.	das heißt
ed.	Editor
eds.	Editors
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFTEM	Energiefilter- Transmissionselektronenmikroskop

EK	Einschlusskörperchen
EM	Elektronenmikroskop
ENV	Erythrocytic Necrosis Viren
et al.	et alteri oder et alii (und andere)
FKS	Fötale Kälberserum
FV-3	Frog virus 3
g	Gramm
GB	<i>Gryllus bimaculatus</i>
GbIV	<i>Gryllus bimaculatus</i> Iridovirus
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEF	Hühnerembryofibroblasten
IG	Gruppe von infizierten Tieren der Spezies <i>Gryllus bimaculatus</i> oder <i>Pogona vitticeps</i>
IIV	Invertebraten-Iridoviren
IIV-3	Invertebrate iridescent virus 3
IIV-6	Invertebrate iridescent virus 6 = CIV (Chilo iridescent virus)
ISH	In-situ-Hybridisierung
ISKNV	Infectious spleen and kidney necrosis virus
IT	Infiziertes Tier der Spezies <i>Gryllus</i> <i>bimaculatus</i> oder <i>Pogona vitticeps</i>
IUDR	5-Jodo-2'-Desoxyuridin
IV GB 20 IT	Iridovirusisolat von <i>Gryllus bimaculatus</i> infiziertes Tier 20 aus Infektionsversuch IV
Jr.	Junior
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Gruppe von nicht infizierten Kontrolltieren der Spezies <i>Gryllus bimaculatus</i> oder <i>Pogona vitticeps</i>

KgaA	Kommanditgesellschaft auf Aktien
KID ₅₀	Kultur-infektiöse Dosis 50 %
KT	nicht infiziertes Kontrolltier der Spezies <i>Gryllus bimaculatus</i> oder <i>Pogona vitticeps</i>
KTR	Kontrolltier der Spezies <i>Pogona vitticeps</i> aus der Reservegruppe
kV	Kilovolt
l	Liter
LCDV-1	Lymphocystis disease virus 1
LEVs	Lizard erythrocytic viruses
M	Molar
m	männlich
MCP	major capsid protein
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mo.	Missouri
mRNA	messenger Ribonucleic acid
MSc	Master of Science in zoology
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N	Normal
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
PCR	polymerase chain reaction
PK	Positivkontrolle
Prof.	Professor
PV	<i>Pogona vitticeps</i>
p.i.	post infectionem

sf-9	Zelllinie von <i>Spodoptera frugiperda</i>
SF-21	<i>Spodoptera frugiperda</i> Pupal Ovary Zellen
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA
TH-1	<i>Terrapene</i> heart Zellen
TM	Trademark
U	Unit
UK	United Kingdom
USA	United States of America
UV	ultraviolett
u.a.	und andere
v	volume
VH2	Viper heart Zellen
w	weiblich
w/v	weight per volume

Tierverzeichnis

<i>Acheta domesticus</i>	Heimchen
<i>Blaptica dubia</i>	argentinische Waldschabe
<i>Bothrops moojeni</i>	Caissaca
<i>Bradypodion fischeri</i>	Fischers Chamäleon
<i>Chamaeleo dilepsis</i>	Lappenchamäleon
<i>Chamaeleo hoehnelii</i>	Helmchamäleon
<i>Chamaeleo quadricornis</i>	Vierhornchamäleon
<i>Chlamydosaurus kingii</i>	Kragenechse
<i>Chondropython viridis</i>	grüne Baumpython
<i>Gehyra variegata</i>	Baum-Gecko (Tree dtella)
<i>Gopherus polyphemus</i>	Gopherschildkröte
<i>Gryllus assimilis</i>	Steppengrille
<i>Gryllus bimaculatus</i>	Zweifleckgrille
<i>Gryllus campestris</i>	Feldgrille
<i>Iguana iguana</i>	grüner Leguan
<i>Lacerta monticola</i>	iberische Gebirgseidechse
<i>Lacerta schreiberi</i>	iberische Smaragdeidechse
<i>Nerodia sipedon sipedon</i>	Siegelringnatter
<i>Pagrus major</i>	Seebrasse
<i>Pogona henrillawsoni</i>	Zwergbartagame
<i>Pogona vitticeps</i>	Bartagame
<i>Siniperca chuatsi</i>	Mandarinfisch
<i>Terrapene carolina carolina</i>	Carolina-Dosenschildkröte
<i>Testudo hermanni</i>	griechische Landschildkröte
<i>Testudo horsfieldii</i>	russische Steppenschildkröte/ Vierzehenschildkröte
<i>Trionyx sinensis</i>	chinesische Weichschildkröte
<i>Uroplatus fimbriatus</i>	Plattschwanzgecko
<i>Vipera russelli</i>	Kettenviper

1 EINLEITUNG

Iridoviren sind große DNA-Viren, die niedere Wirbeltiere und Invertebraten infizieren können. Invertebraten werden durch Vertreter der Genera *Iridovirus* und *Chloriridovirus* infiziert. Bei Insekten führen patente Infektionen meist zum Tod und die Tiere weisen oft eine irisierende Färbung auf, die zur Namensgebung führte. Allerdings kommen auch inapparent verlaufende Infektionen vor, bei denen die Tiere gesund erscheinen und nicht sterben.

In Europa traten Ende der 90er Jahre in einigen kommerziellen Grillenzuchten Probleme mit erhöhter Mortalität und reduzierter Fruchtbarkeit auf. Im Rahmen der Untersuchungen der vermehrten Todesfälle konnten von zwei Arbeitsgruppen in Deutschland Viren des Genus *Iridovirus* aus Grillen (Orthoptera, Gryllidae) der Spezies *Gryllus campestris*, *Acheta domesticus* und *Gryllus bimaculatus* (GB) isoliert werden. Die untersuchten Zuchten produzierten Grillen, die als Lebendfutter für Wirbeltiere, insbesondere Reptilien, verkauft wurden.

Parallel zu den auftretenden Iridovirusinfektionen bei kommerziellen Grillenzuchten wurden in den letzten Jahren zunehmend Iridoviren bei Reptilien beschrieben. Die bei Reptilien nachgewiesenen Iridoviren werden in die Genera *Ranavirus* und *Iridovirus* der Familie *Iridoviridae* eingeordnet. Der Nachweis von Viren des Genus *Iridovirus* bei Reptilien ist besonders bemerkenswert, da diese Viren zuvor ausschließlich bei Invertebraten beschrieben wurden. Invertebraten-Iridoviren (IIV) konnten bisher aus Echsen der Spezies *Chamaeleo quadricornis*, *Chamaeleo hoehnelii*, *Chlamydosaurus kingii*, *Iguana iguana* und *Pogona vitticeps* (PV) isoliert werden. Die bei der Untersuchung meist schon gestorbenen Tiere waren vor allem abgemagert und zeigten teilweise Hautveränderungen. Unklar war, ob die isolierten Viren zu den Symptomen der Tiere führten, oder ob diese andere Ursachen hatten. Der Nachweis von IIV bei Reptilien könnte sowohl für in Gefangenschaft gehaltene als auch für wildlebende Tiere von

Bedeutung sein. Es wird postuliert, dass die IIV einen Wirtswechsel von den Futtertieren auf die Echsen vollzogen haben.

In dieser Studie wurde versucht durch Transmissionsversuche die Pathogenität von aus Echsen isolierten IIV-artigen Viren in Insekten und Echsen zu untersuchen. Das verwendete Isolat 100/01 wurde aus der Lunge eines toten Helmchamäleon (*Chamaeleo hoehnelii*) isoliert (MARSCHANG et al., 2002) und als mögliches Iridovirus identifiziert.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Familie *Iridoviridae*

Iridoviren sind 120 bis 200 (300) nm große DNA-Viren mit einem ikosaedrischen Kapsid und einer Lipidkomponente im Aufbau. Einige Vertebraten-Iridoviren besitzen durch Budding an der Wirtszellmembran eine Hülle. Diese kann auch bei Invertebraten-Iridoviren, die in Zellkultur isoliert wurden, vorhanden sein, ist aber nicht essentiell für eine Infektion. Die Familie *Iridoviridae* wird zur Zeit in fünf Genera unterteilt: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus*. Das Genom, das aus einem einzelnen Molekül linearer doppelsträngiger DNA (140-303 kbp) besteht, ist bei den Vertebratenviren (Genera *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus*) durch die Methylierung von circa (ca.) 20 % seines Cytosinanteiles charakterisiert, um sie vor einem Abbau durch Endonukleasen von Vertebraten zu schützen (GOORHA et al., 1984; CHINCHAR et al., 2005). Bei Vertretern der Genera *Iridovirus* und *Chloriridovirus* wurden bisher keine Hinweise auf methylierte DNA gefunden. Bei allen Iridoviren ist das Genom sowohl circularly permuted als auch terminally redundant (GOORHA und MURTI, 1982; CHINCHAR et al., 2005). Das bedeutet, dass jedes Viruspartikel ein komplettes Genom beinhaltet (plus ca. 10 % zusätzliche DNA), aber die Endsequenz eines jeden Partikels in einer Population unterschiedlich ist (zirkulärer Tausch) (WILLIAMS, 1996). Das ikosaedrische Kapsid der Virionen besteht aus dem ca. 50 kDa großen major capsid protein (MCP), das ca. 40 % des Gesamtproteinanteiles umfasst (WILLIS et al., 1977; WILLIAMS, 1996; CHINCHAR et al., 2005). Einige Autoren untersuchten Nukleotidsequenzen des hochkonservierten MCP-Gens (SCHNITZLER und DARAI, 1993; STOHWASSER et al., 1993; WILLIAMS und CORY, 1994; MAO et al., 1997). Untersuchungen von TIDONA et al. (1998) zeigen, dass ein Vergleich dieser Nukleotidsequenzen eine hilfreiche Methode für ein neues Klassifizierungssystem von Iridoviren sein kann. Nach HYATT et al. (2000) kann allerdings keine einzelne Technik allein zur Identifikation von Virusisolaten dienen. Eine Klassifizierung als

Iridovirus sollte nicht ausschließlich auf partiellen Daten über Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen hochkonservierter Abschnitte des Genoms basieren, bevor nicht mehr Gene oder vorzugsweise das gesamte Genom verschiedener Spezies von Iridoviren sequenziert und analysiert wurden. Bei Vertretern der Genera *Iridovirus* und *Chloriridovirus* zeigen patente Infektionen von Insektenwirtstieren und gereinigte Pellets von Viren oft eine irisierende Färbung, was zur Namensgebung führte. Die Irideszenz resultiert aus der massenhaften Ansammlung von IIV-Partikeln, die parakristalline Bereiche im Zytoplasma von Wirtszellen bilden. Dadurch kommt es zu konstruktiver Interferenz (Bragg Reflektionen nach HALL (1985)) zwischen einfallendem und reflektiertem Licht, die zu der irisierenden Färbung führt (CONSTANTINO et al., 2001). Es wurden aber auch Infektionen, die nicht mit Irideszenz einhergehen beobachtet. Dabei erscheinen die infizierten Insekten gesund und die Infektion verläuft nicht tödlich (CONSTANTINO et al., 2001). Frühere Untersuchungen mit Iridoviren haben gezeigt, dass sowohl die Typspezies des Genus *Ranavirus*, Frog virus 3 (FV-3), als auch die Typspezies des Genus *Iridovirus*, Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6), eine Hepatitis bei Mäusen verursachen und zum Tod der infizierten Tiere führen können. Dies ist auf einen toxischen Effekt der Viren zurückzuführen (BINGEN et al., 1982; LORBACHER DE RUIZ et al., 1986). Untersuchungen von BINGEN et al. (1982) haben gezeigt, dass ein Strukturprotein für diese toxische Effekte verantwortlich sein muss.

Tabelle 1: Genera der Familie *Iridoviridae*

Genus	Eigenschaften
<i>Iridovirus</i>	Typspezies: Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6) Größe: 120 – 130 nm Genom: nicht methyliert Wirte: großes Spektrum an Arthropoden Patente Infektionen weisen oft eine violett-, blau- oder türkis-irisierende Färbung auf
<i>Chloriridovirus</i>	Typspezies: Invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3) Größe: ca. 180 nm Genom: nicht methyliert Wirte: vor allem Insekten aus dem Genus Diptera Patente Infektionen weisen oft eine gelb-grüne-, orange- oder rot-irisierende Färbung auf
<i>Ranavirus</i>	Typspezies: Frog virus 3 (FV-3) Größe: ca. 150 nm behüllt 160 – 200 nm Genom: stark methyliert Wirte: Amphibien, Fische und Reptilien
<i>Lymphocystivirus</i>	Typspezies: Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1) Größe: 140 – 300 nm Genom: stark methyliert Wirte: Fische Mortalität gering (gutartige Umfangsvermehrungen)
<i>Megalocytivirus</i>	Typspezies: Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) Größe: 140 – 200 nm Genom: stark methyliert Wirte: Fische Entstehung von Zellen mit Einschlusskörperchen

2.1.1 Genus *Iridovirus*

Die Typspezies des Genus *Iridovirus* ist das IIV-6, das auch Chilo iridescent virus genannt wird. Die Viren dieses Genus sind 120 bis 130 nm groß und weltweit verbreitet. Iridoviren wurden aus einem großen Spektrum von Arthropoden, insbesondere aus Insekten aus Wasser- oder Feuchthabitaten, isoliert. Patente Infektionen von Insektenwirtstieren und gereinigte Pellets von Viren zeigen oft eine violett-, blau-, oder türkis-irisierende Färbung. Inapparente nicht tödliche Infektionen scheinen in bestimmten Wirten gängig zu sein. Bisher gibt es keine Hinweise auf transovariable Übertragung bei Arthropoden. In den Fällen, bei denen bisher eine horizontale Übertragung

demonstriert wurde, erfolgte diese durch Kannibalismus oder Verzehr von infizierten Invertebratenwirten. Viele Mitglieder des Genus können sich nach einer Injektion von Virusmaterial in einer großen Anzahl von verschiedenen Insektenwirten vermehren. Das Wirtsspektrum in freier Natur scheint zu variieren und es gibt Hinweise auf natürliche Übertragungen einiger Viren zwischen verschiedenen Ordnungen und gar Phyla von Insekten (CHINCHAR et al., 2005).

2.1.2 Genus *Chloriridovirus*

Die circa 180 nm große Typspezies des Genus *Chloriridovirus* ist das Invertebraten-Iridovirus 3 (IIV-3). IIV-3 ist bisher das einzige Virus dieses Genus, obwohl weltweit über 20 Wirtsspezies mit patenten Infektionen gefunden wurden. Chloriridoviren scheinen nur bei dem Genus Diptera aufzutreten. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Moskitos, deren Larvenstadien im Wasser leben. Sie können horizontal durch Kannibalismus und Beuteverzehr und auch transovariell (LINKEY und NIELSEN, 1968) übertragen werden. Patente Infektionen bei Larven von Wirtstieren und gereinigte Pellets von Viren zeigen gewöhnlich eine gelb-grüne Irideszenz, wobei auch orange und rote Färbungen vorkommen (CHINCHAR et al., 2005).

2.1.3 Genus *Ranavirus*

Ranaviren sind ca. 150 nm groß und teilweise behüllt, wobei sie dann 160 bis 200 nm messen. Ihr Genom ist stark methyliert. Die Typspezies dieses Genus ist das FV-3. Ursprünglich wurden Ranaviren nur bei Amphibien beschrieben (GRANOFF et al., 1965). Seit Beginn der 90er Jahre werden sie zunehmend im Zusammenhang mit Epizootien bei Amphibien und Fischen weltweit nachgewiesen (DASZAK et al., 1999; CHINCHAR, 2002; DOCHERTY et al., 2003). Zudem werden sie von einigen Autoren auch für das seit Jahren beobachtete Amphibiensterben mitverantwortlich gemacht (CUNNINGHAM et al., 1996; BOLLINGER et al., 1999; GREEN et al., 2002;

DOCHERTY et al., 2003). Bei Reptilien wurden die ersten Ranavirusisolate Ende der 90er Jahre beschrieben. Die Übertragung von Viren des Genus Ranavirus ist oral und durch parenterale Injektion oder umweltbedingte Exposition möglich. Die Pathogenität der erfolgten Infektion hängt von der Wirtsspezies und deren Lebensstadium ab (CHINCHAR et al., 2005).

2.1.4 Genus *Lymphocystivirus*

Obwohl alle Vertreter des Genus *Lymphocystivirus* sehr ähnliche Krankheitsbilder hervorrufen, variiert die Größe dieser Viren zwischen 140 und 300 nm. Die Typspezies, das Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1), ist ca. 198 bis 227 nm groß. Infektionen mit Lymphocystiviren treten bei verschiedenen Fischarten auf. Vor allem in Fischzuchten stellen sie ein großes ökonomisches Problem dar. Bei einer Infektion kommt es zu chronischen tumorähnlichen Läsionen auf der Haut und den Flossen der Fische (AHNE et al., 1997; MAO et al., 1997). Die Übertragung erfolgt durch Kontakt. Die Mortalität ist nur sehr gering, da es sich um gutartige Umfangsvermehrungen handelt; aber der wirtschaftliche Schaden ist erheblich. Lymphocystiviren besitzen ein hoch methyliertes Genom.

2.1.5 Genus *Megalocytivirus*

Das Genus *Megalocytivirus* mit der Typspezies Infectious spleen and kidney necrosis virus (ISKNV) beinhaltet Viren mit einer Größe von 140 bis 200 nm, deren Genom hoch methyliert ist. Vertreter dieses Genus infizieren Fische der Spezies *Pagrus major* (Seebrasse), *Siniperca chuatsi* (Mandarinfisch) und über zwanzig weitere Meeres- und Tropen-Fischarten und sind für einen signifikanten Anstieg der Mortalität in Fischzuchten weltweit verantwortlich. Eine Infektion ist durch die Entstehung von Zellen mit Einschlusskörperchen charakterisiert (CHINCHAR et al., 2005).

2.1.6 Noch nicht einem Genus der Familie *Iridoviridae* zugeordnete Viren

Neben den fünf Genera gibt es einige noch nicht einem Genus der Familie *Iridoviridae* zugeordnete Isolate. Das Vorhandensein von großen Viruspartikeln ohne Hülle in Assembly sites und in parakristallinen Arealen im Zytoplasma von infizierten Zellen ist charakteristisch für Iridovirus-Infektionen. Aufgrund dieser charakteristischen morphologischen Merkmale wurden verschiedene Viren, die ektotherme Tiere infizieren, ohne weitere molekulare oder serologische Charakterisierung vorläufig den Iridoviren zugeordnet. Darüber hinaus ist, da sich viele dieser Viren bisher nicht in Zellkulturen vermehren, wenig über ihre Art sich zu replizieren und ihre molekulare Organisation bekannt (CHINCHAR et al., 2005).

Eine Besonderheit unter den noch nicht zugeordneten Viren stellen die Erythrocytic Necrosis Viren (ENV) dar. ENV führen in Erythrozyten zu Einschlusskörperchen, die aus Arealen von Viruspartikeln bestehen und bei Amphibien (GRUIA-GRAY et al., 1989; SPEARE et al., 1991; GRUIA-GRAY und DESSER, 1992), Fischen und Reptilien (STEBENS und JOHNSTON, 1966; TELFORD, Jr. und JACOBSON, 1993; SMITH et al., 1994; JOHNSRUDE et al., 1997; ALVES DE MATOS et al., 2002) auftreten (ESSBAUER und AHNE, 2001). Intraerythrozytäre Einschlüsse werden schon seit über 30 Jahren bei verschiedenen Spezies von niederen Vertebraten beschrieben. Ursprünglich hielt man einen parasitären Protozoen namens *Toddia* oder *Pirhemocyton* für die Ursache. Aber elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigen, dass die Einschlusskörperchen (EK) aus Bereichen von Iridovirus-ähnlichen Partikeln verschiedener Größen, je nach Wirt bis zu 450 nm, bestehen.

2.2 Iridoviren bei Grillen

Einige Autoren, die sich mit den Insekten-Iridoviren befasst haben, haben für deren Einsatz zur biologischen Kontrolle von Schadinsekten plädiert (KLEESPIES et al., 1999; HERNANDEZ et al., 2000; JAKOB et al., 2001; HENDERSON et al., 2001). Schließlich können IIV einige wichtige Insektenspezies, die als landwirtschaftliche Plagen gelten (KLEESPIES et al., 1999; JAKOB et al., 2001; HENDERSON et al., 2001) und Vektoren humanpathogener Erkrankungen (HERNANDEZ et al., 2000) tödlich infizieren.

Ende der 90er Jahre traten in einer kommerziellen Insektenzucht in den Niederlanden, ca. drei Monate nach Einfuhr einer neuen Grillenspezies (*Gryllus assimilis*) und neuer Tiere der Spezies *Acheta domesticus*, Mortalitätsprobleme auf. Die beiden Spezies wurden räumlich voneinander getrennt bei 30 °C und 65 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Tiere stammten aus Europa (*Gryllus assimilis*) und den USA (*Acheta domesticus*). Zuerst wurden bei *Gryllus assimilis* vergrößerte Abdomen festgestellt. Später kam es dann zum Massensterben. Bei den histologischen Untersuchungen von *Gryllus assimilis* konnten mit einer homogenen basophilen Masse angefüllte, vergrößerte Fettkörperzellen gefunden werden. Zudem konnten im Elektronenmikroskop (EM) Iridovirus-ähnliche Partikel im Fettkörper detektiert werden. Zusätzlich spielte in diesem Fall das Bakterium *Serratia marcescens* eine pathogene Rolle (CALIS und ZWART, 1998). Nach Auskunft von Professor P. Zwart (persönliche Mitteilung) hat diese sehr große Insektenzucht vor und nach diesen Vorfällen große Mengen von Insekten an verschiedene andere Zuchten in Europa weitergegeben.

Kurze Zeit später wurden von zwei Arbeitsgruppen in Deutschland Iridoviren aus Grillen (Orthoptera, Gryllidae) der Spezies *Gryllus campestris* und *Acheta domesticus* (KLEESPIES et al., 1999) und *Gryllus bimaculatus* (JUST und ESSBAUER, 2001) isoliert und charakterisiert. In beiden Fällen stammten die Tiere aus kommerziellen Insektenzuchten.

Bei Nymphen und Adulten der zwei Grillenspezies *Gryllus campestris* und *Acheta domesticus*, die 1996 von einem holländischen Grillenzüchter bezogen wurden, konnten durch KLEESPIES et al. (1999) eine ungewöhnlich hohe Mortalität und extrem reduzierte Fruchtbarkeit und Lebensspanne bestätigt werden. Bei der Sektion der gestorbenen Tiere fiel der auffallend hypertrophierte Fettkörper auf, der eine bläulich irisierende Färbung aufwies, die typisch für eine Iridovirus-Infektion ist. In der Lepidopteran-Zelllinie von *Choristoneura fumiferana* CF-124 führte das Isolat schon ab 24 Stunden nach der Infektion zu Zelllyse, Zellabrundung und Hypertrophie. Die zytopathologischen Untersuchungen zeigten im Zytoplasma der hypertrophierten Fettkörperzellen ein Netzwerk von dichtem, granulärem viralem Stroma. Genetische Analysen der gereinigten viralen DNA mittels verschiedener Restriktionsenzyme ergaben, dass sich das Isolat von allen bis dahin isolierten Insekten-Iridoviren unterschied. Elektronenmikroskopische Untersuchungen führten zur Identifikation eines neuen Iridovirus, das Cricket Iridovirus (CrIV) genannt wurde. In negativ kontrastierten Präparaten waren die ikosahedralen Viruspartikel 151 bis 167 nm groß. In Untersuchungen zur Wirtsspezies konnte CrIV oral auf andere Orthoptera-Spezies übertragen werden, zu denen auch *Gryllus bimaculatus* zählte. In zwei Infektionsversuchen wurden Tiere im dritten Larvenstadium 30 Sekunden in Virussuspension gedippt. Diese Virussuspension beinhaltete $2,2 \times 10^{11}$ CrIV Partikel/ml. Über 50 Tage wurde, bei einem Temperaturregime von 25 °C am Tag und 20 °C bei Nacht, täglich die Mortalität überprüft. Schon nach 14 Tagen führte CrIV bei den infizierten Tieren zu offenkundigen Zeichen und Symptomen einer Virusinfektion. Zu den beobachteten Symptomen gehörten geschwollene Abdomen und eine reduzierte Aktivität der Tiere. Bei der Sektion war der Fettkörper hypertrophiert und infizierte Fettkörperzellen wiesen eine bläuliche Irideszenz auf. Nach der Infektion durch Dippen in Virussuspension lag die Mortalität bei 93 %. Dagegen konnte beim Verfüttern infizierten Futters nur eine Mortalität von 48 % erreicht werden. Die Virulenz von CrIV wurde durch die mittlere Überlebenszeit ausgedrückt und lag nach Dippen bei 22,4 Tagen und nach

Verfüttern infizierten Futters bei 37,3 Tagen. Das von KLEESPIES et al. (1999) isolierte CrIV wurde von JAKOB et al. (2002) in Bezug auf Genom und Wirtsspektrumcharakteristika mit IIV-6, der Typspezies des Genus *Iridovirus*, verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass in Infektionsversuchen alle Insektenspezies in allen Entwicklungsstadien gleichermaßen oral empfänglich für CrIV und IIV-6 waren. Verschiedene Genloci der beiden Isolate wurden analysiert und verglichen, darunter auch das MCP-Gen. Im Durchschnitt ergab sich eine Identität der ausgesuchten Nukleotidsequenzen und entsprechenden Aminosäuresequenzen von 95,98 bzw. 95,18 %. Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass CrIV und IIV-6 keine verschiedenen Spezies innerhalb der Familie *Iridoviridae* sind, sondern CrIV eine neue Variante und/oder ein neuer Stamm von IIV-6 ist. Zusammenfassend konnte ermittelt werden, dass es sich bei dem aus den Futtertieren *Gryllus campestris* und *Acheta domesticus* isolierten Isolat um ein IIV aus dem Genus *Iridovirus* handelt.

Die zweite Arbeitsgruppe JUST und ESSBAUER (2001) bezogen die Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* von einer lokalen Zoohandlung in Bayern, die die Grillen ursprünglich von einem bayerischen Züchter erworben hatte. Im Labor wurden die Grillen in Gruppen von 20 Adulten bei 20 °C und 70-80 % relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Den Grillen stand natürliches Licht und uneingeschränkter Zugang zu Futter und Wasser zur Verfügung. Unter diesen Bedingungen starben alle Individuen innerhalb von 14 Tagen unter klinisch offensichtlichem Verhalten wie Apathie, Ataxie und Desorientierung. Die Hälfte der gestorbenen Grillen wurde mit einem Transmissions-elektronenmikroskop auf das Vorhandensein von Viruspartikeln untersucht. Die zweite Hälfte der Grillen wurde bei -20 °C eingefroren und nach und nach für Untersuchungen zur Virusisolation und Viruscharakterisierung verwendet. In einer Zellkultur der Lepidopteran-Zelllinie von *Spodoptera frugiperda* sf-9 führte die Inokulation mit Überstand von Fettkörperhomogenat bei 28 °C innerhalb von acht Tagen zu fortschreitenden zytopathischen Effekten. Dazu zählten unter anderem Zellhypertrophie, zytoplasmatische

Vakuolisierung und Zelllysis. Für die Vermehrung einer ca. 500 bp langen Region des MCP wurde eine polymerase chain reaction (PCR) mit Primern nach WEBBY und KALMAKOFF (1998) durchgeführt. Die 420 bp lange amplifizierte DNA wurde sequenziert und mit den korrespondierenden MCP-Gensequenzen von 14 ausgesuchten Mitgliedern der Familie *Iridoviridae* verglichen. Das isolierte PCR-Produkt war zu 97,8 % identisch mit der entsprechenden Sequenz des MCP-Gens von IIV-6. Der Restriktionsenzymverdau mit den Endonukleasen MspI und HpaII wies auf das Fehlen methylierter DNA hin. Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass die gefundenen Viruspartikel 148 bis 172 nm groß waren. Sie entsprachen morphologisch den Iridoviren, waren auf den Fettkörper beschränkt und konnten auch in den infizierten Zellkulturen detektiert werden. Zusammenfassend wurde gefolgert, dass das Isolat *Gryllus bimaculatus iridescent virus* (GbIV) genannt werden sollte und in das Genus *Iridovirus* der Familie *Iridoviridae* einzuordnen ist.

Die von KLEESPIES et al. (1999) und JUST und ESSBAUER (2001) untersuchten Tiere stammten alle aus kommerziellen Insektenzuchten, die Grillen für die Verfütterung an Wirbeltiere produzierten. Die Möglichkeit, dass diese Viren von Invertebraten auf Vertebraten durch Fressen übertragen werden können, könnte im Falle eines Einsatzes von Insekten-Iridoviren zur biologischen Kontrolle von Schadinsekten unvorhersehbare Auswirkungen auf die Umwelt haben.

2.3 Iridoviren bei Reptilien

2.3.1 Histologische Nachweise von Iridoviren bei Schildkröten

Erst nachdem Iridoviren bei Insekten, Amphibien und Fischen gefunden wurden, gab es die ersten Berichte über Iridoviren bei Reptilien, genauer gesagt Schildkröten (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; MÜLLER et al., 1988; WESTHOUSE et al., 1996). HELDSTAB und BESTETTI (1982) entdeckten bei einer griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni*), die nach zweitägiger Anorexie gestorben war, zahlreiche intrazytoplasmatische EK aus Iridovirus-artigen Partikeln in der Leber. Histologisch waren bei diesem Tier fokale Nekrosen der Leber, des Darmes und der Milz auffällig. Es wurde kein Virus isoliert.

MÜLLER et al. (1988) bekamen von einem schweizer Zoonhändler, der ca. 2000 griechische Landschildkröten (*Testudo hermanni*) aus Jugoslawien importiert hatte, zehn Tiere zur Untersuchung. Innerhalb von einem Monat waren ca. 200 Tiere gestorben. Tiere, die innerhalb von ein bis zwei Tagen starben, zeigten lediglich ein Hängenlassen des Kopfes, Maulatmung und ein subkutanes Halsödem. Beim subakuten Verlauf zeigten die Tiere eitrig-rhinitische und Konjunktivitis, Pneumonie, Stomatitis ulzerosa und Anasarka als Symptome. Histologisch konnten unter anderem Nekrosen, Petechien und intrazytoplasmatische basophile EK in der Leber, Milznekrosen und eine diffuse, purulente, interstitielle Bronchopneumonie gefunden werden. Die EK konnten auch mit dem Elektronenmikroskop nachgewiesen werden. Sie bestanden aus Ansammlungen von hexagonalen, 135 bis 150 nm großen Viruspartikeln mit einem elektronendichten Kapsid. Auch hier wurde kein Virus isoliert.

Im Jahre 1992 konnte WESTHOUSE et al. (1996) bei einer Schildkröte der Spezies *Gopherus polyphemus* aus Florida, in degeneriertem und nekrotischem Gewebe des Respirationstraktes, intrazytoplasmatische EK und ikosahedrale 150 bis 220 nm große Viruspartikel nachweisen. Das Tier

litt vor der Euthanasie an Symptomen des oberen Respirationstraktes. Bei der Sektion konnten eine nekrotisierende ulzerative Tracheitis, Pharyngitis und Ösophagitis und eine nekrotisierende Pneumonie gefunden werden.

2.3.2 Erythrocytic Necrosis Viren bei Reptilien

Erythrocytic Necrosis Viren stellen eine Besonderheit unter den noch nicht zugeordneten Viren der Familie *Iridoviridae* dar. ENV führen in Erythrozyten zu Einschlusskörperchen, die aus Iridovirus-ähnlichen Viruspartikeln bestehen. Bei Reptilien wurden ENV bisher unter anderem bei einem Gecko der Spezies *Gehyra variegata* (STEBBENS und JOHNSTON, 1966), bei Chamäleons der Spezies *Chamaeleo dilepis* und *Bradypodion fischeri* (TELFORD, Jr. und JACOBSON, 1993), Schlangen der Spezies *Nerodia sipedon sipedon* (SMITH et al., 1994) und *Bothrops moojeni* (JOHNSRUDE et al., 1997) und Echsen der Spezies *Lacerta monticola* und *Lacerta schreiberi* (ALVES DE MATOS et al., 2002) beschrieben.

STEBBENS und JOHNSTON (1966) waren die ersten, die bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen von Erythrozyten eines Geckos Iridovirus-ähnliche Partikel entdeckten. Ursprünglich hielt man die Einschlüsse für das Protozoon *Pirhemocytion tarentolae*.

ALVES DE MATOS et al. (2002) führten Infektionsversuche mit *Lacerta monticola* und *Lacerta schreiberi* aus der Serra da Estrela in Portugal durch. Lizard erythrocytic viruses (LEVs) führen zu Einschlüssen im Zytoplasma von Erythrozyten bei Echsen. Um Informationen über den Einfluss einer Infektion mit LEVs auf den Wirt zu gewinnen, untersuchten ALVES DE MATOS et al. (2002) die Erythrozyten im peripheren Blut, viszerale Organe und Knochenmark von peritoneal infizierten Echsen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Infektion mit LEVs in der Regel auf die Erythrozyten beschränkt ist, aber gelegentlich auch eine systemische Infektion vorkommen kann, die zu Erkrankung führt. Im ersten Fall konnte eine Prävalenz an infizierten Erythrozyten von 98 %, gefolgt von einer Genesung, beobachtet werden. Bei

einer systemischen Infektion kam es auch zur Infektion von Leukozyten, die zum Tod der infizierten Tiere führte.

2.3.3 Ranavirusisolate aus Reptilien

Ende der 90er Jahre wurden die ersten Iridovirusisolate bei Reptilien beschrieben. Diese Iridoviren, die zunächst alle zum Genus *Ranavirus* gehörten, wurden bei verschiedenen Schildkrötenspezies, teilweise im Zusammenhang mit systemischen Erkrankungen, gefunden (MAO et al., 1997; MARSCHANG et al., 1999; CHEN et al., 1999; DE VOE et al., 2004).

Auf der Basis von Teilsequenzen des MCP-Gens hatten MAO et al. (1997) zwei Iridoviren, die aus zwei nordamerikanischen Schildkröten der Spezies *Testudo horsfieldii* (TV5) und *Terrapene carolina carolina* (TV3) isoliert wurden, mit einigen neu isolierten Fischviren in das Genus *Ranavirus* eingeordnet.

MARSCHANG et al. (1999) konnten 1996 aus zwei Tieren aus einer Gruppe von sieben gestorbenen jungen Schildkröten der Spezies *Testudo hermanni*, die aus einem Zoo aus der Schweiz stammten, ein Ranavirus isolieren. In histologischen Untersuchungen konnte bei allen sieben Tieren eine Inflammation der Mukosa von der Mundhöhle, über Zunge, Pharynx, Ösophagus, Magendarmtrakt bis zur Kloake festgestellt werden, die lokal mit Nekrosen einherging. Zudem konnten basophile runde intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in den Epithelzellen des Magendarmtraktes, in den Hepatozyten und bei einem Tier im Epithel der Lunge gefunden werden. In der Zellkultur war die Virusisolierung auf *Terrapene heart* Zellen (TH-1) bei 28 °C erfolgreich. Das Virus konnte bei 28 °C, jedoch nicht bei 37 °C, in verschiedenen Zelllinien von Reptilien, Vögeln und Säugetieren vermehrt werden. Die Einordnung des Isolates in das Genus *Ranavirus* erfolgte aufgrund von Sensitivität gegenüber Chloroform, Inhibition der Virusreplikation durch 5-Jodo-2'-Desoxyuridine (IUDR), Größe und Morphologie der Viruspartikel bei den elektronenmikroskopischen

Untersuchungen und des Nichtverdaus durch das Restriktionsenzym HpaII. Zusätzlich wurde in Anlehnung an MAO et al. (1997) zur Amplifizierung eines hochkonservierten Bereiches des MCP-Gens eine PCR durchgeführt und das ca. 500 bp lange PCR-Produkt sequenziert. Der Vergleich der Nukleotidsequenz mit der anderer Ranaviren ergab eine nahe Verwandtschaft mit FV-3, der Typspezies des Genus *Ranavirus*.

In China konnten CHEN et al. (1999) 1997 aus Schildkröten der Spezies *Trionyx sinensis*, die kommerziell auf einer Farm für die Lebensmittelgewinnung gehalten wurden, ein Iridovirus isolieren. Das Isolat konnte vor allem von Jungtieren, die an der sogenannten Rotnackenerkrankung erkrankt waren, gewonnen werden. Auffälligstes Symptom war der geschwollene und gerötete Nacken der Tiere. Bei der Sektion konnten petechiale Blutungen auf der Leber gefunden werden. Das Isolat konnte zwischen 15 und 30 °C in verschiedenen Zelllinien vermehrt werden, war empfindlich gegenüber Chloroform und die Virusvermehrung konnte durch IUDR gehemmt werden. Bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnten 120 bis 160 nm große hexagonale Viruspartikel nachgewiesen werden. In einem Infektionsversuch mit dem gewonnenen Isolat wurde versucht, je zehn Schildkröten mittels Baden in kontaminiertem Wasser und intramuskulärer Injektion zu infizieren. Dabei konnten Tiere infiziert und Virus reisoliert werden. Im Vergleich zu Infektionen in kommerziellen Farmen war die Virulenz moderat; die Mortalität lag unter 40 %.

Im Jahre 2002 konnten DE VOE et al. (2004) von zwei Tieren aus einer Gruppe von Schildkröten der Spezies *Terrapene carolina carolina* ein Virus des Genus *Ranavirus* isolieren. Die Tiere stammten aus einer privaten Zucht von über hundert Tieren verschiedener Spezies. Fünf Schildkröten wurden lebend untersucht. Es konnten unter anderem Hautabszesse, orale Erosionen, Mundabszesse und Respirationsprobleme beobachtet werden. Fünf Tiere starben und wurden seziiert. Histologisch konnte eine fibrinöse

Vaskulitis der Haut, der mukösen Membranen, der Lunge und der Leber festgestellt werden. Aus zwei Tieren konnte ein Isolat gewonnen werden und elektronenmikroskopisch und mittels einer PCR und Sequenzierung eines Teiles des MCP-Genes in das Genus *Ranavirus* eingeordnet werden. Zwei der erkrankten Tiere erholten sich von den Symptomen, die von diesen Tieren gewonnenen Rachentupfer waren in den Untersuchungen negativ.

Ranaviren wurden auch bei Schlangen (HYATT et al., 2002) identifiziert. Am internationalen Flughafen von Cairns in Australien wurden im Jahre 1998 zehn junge grüne Baumpythons (*Chondropython viridis*) aufgegriffen. Die Tiere stammten ursprünglich aus Indonesien und kamen beim Versuch, illegal von Papua-Neuguinea nach Australien eingeführt zu werden, nach Cairns. Die Tiere wurden konfisziert und in Quarantäne gehalten. Drei Tiere verstarben, die anderen wurden euthanasiert. Histologische Untersuchungen zeigten bei zwei der gestorbenen Schlangen schwere chronische Ulzerationen der nasalen Mukosa, Degenerationen und Nekrosen der Leber und eine schwere nekrotisierende Entzündung der Submukosa des Pharynx. Aus Proben von zwei von 10 Tieren konnte in Zellkultur das *Wamena Virus*, das zum Genus *Ranavirus* gehört, isoliert werden und die Einordnung durch Immunhistochemie, Elektronenmikroskopie, enzym linked immunosorbend assay, sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, PCR, Sequenzanalyse, Restriktionsenzymverdau und DNA-Hybridisierung bestätigt werden.

MARSCHANG et al. (2002) konnten aus einem Gecko der Spezies *Uroplatus fimbriatus* ein Iridovirus des Genus *Ranavirus* isolieren. Der Gecko zeigte bei der Sektion an mehreren Körperstellen granulomatöse Läsionen. Aus der Leber und dem Magen konnten in den beiden Zelllinien TH-1 und Hühnerembryofibroblasten (HEF) zytopathogene Agenzien isoliert werden. Eine Behandlung mit Chloroform und eine Kultivierung mit IUDR führte zu vollständigem bzw. weitgehendem Verlust der Infektiösität und im Elektronenmikroskop konnten Iridovirus-ähnliche Partikel gefunden werden.

Ein Restriktionsenzymverdau mit den Enzymen MspI und HpaII ergab, dass der Cytosinanteil der DNA von CpG Sequenzen größtenteils methyliert war. Die Nukleotidsequenz des Genombereiches, der die Aminosäuren 15 bis 463 des MCP des Isolates kodiert, war zu 98,4 % identisch mit der Sequenz des MCP-Gens von FV-3.

2.3.4 Noch nicht einem Genus der Familie *Iridoviridae* zugeordnete Isolate aus Chamäleons

Es gibt Berichte über Isolate aus Chamäleons, bei denen bisher noch unklar ist, in welches Genus der Familie *Iridoviridae* die isolierten Viren einzuordnen sind. DRURY et al. (2002) konnten im Vereinigten Königreich aus drei Chamäleons der Spezies *Chamaeleo quadricornis* und *Chamaeleo hoehnelli* Iridoviren gewinnen. Ein Tier der Spezies *Chamaeleo hoehnelli*, das einige Monate zuvor aus Deutschland bezogen wurde, war schon gestorben und zwei Tiere der Spezies *Chamaeleo quadricornis*, die in benachbarten Terrarien untergebracht wurden, waren erkrankt. Bei dem gestorbenen Tier der Spezies *Chamaeleo hoehnelli* konnte in der Sektion eine Glomerulosklerose diagnostiziert werden. Aus der Kotprobe eines adulten *Chamaeleo quadricornis* konnte schließlich auf HEF-Kulturen ein Isolat gewonnen werden, das sich bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen als Iridovirus-ähnlich mit einer Größe von 143 nm herausstellte. Nach diesen Ergebnissen wurden Kot- und Rachentupfer der verbliebenen Tiere der Gruppe untersucht. Im Elektronenmikroskop konnten Iridovirus-ähnliche Partikel in den Kotproben eines adulten *Chamaeleo quadricornis* und seines Jungtieres gefunden werden. Bei dem adulten Tier handelte es sich um ein gesund erscheinendes in freier Wildbahn gefangenes Tier. Sein Jungtier hingegen war gestorben. Aus sechs untersuchten Rachentupfern konnten Iridovirus-ähnliche Partikel isoliert und elektronenmikroskopisch dargestellt werden.

2.3.5 Invertebraten-Iridoviren aus Echsen

Ende der 90er Jahre waren auch Reptilien als Wirtsspezies für Iridoviren des Genus *Ranavirus* etabliert. Allerdings waren Viren des Genus Iridovirus bis dahin nur bei Arthropoden isoliert worden, bis in den Jahren 1998 bis 2000 Viren, die mit IIV identisch zu sein scheinen, aus toten Echsen verschiedener Spezies isoliert wurden (JUST et al., 2001). Die dort beschriebenen Viren wurden aus der Lunge, der Leber, der Niere und dem Darm von zwei Bartagamen (*Pogona vitticeps*) und einem Chamäleon (*Chamaeleo quadricornis*) sowie aus der Haut einer Kragenechse (*Chlamydosaurus kingii*) gewonnen. Alle Tiere starben vor der Untersuchung. Eine Bartagame zeigte vor dem Tod Symptome einer Pneumonie und die Kragenechse wies pockenähnliche Hautveränderungen auf. Sie gehörte zu einer Gruppe frisch importierter Tiere, von denen einige mit Hautveränderungen und Abmagerung gestorben waren. Die Isolate konnten in einer Zellkultur von Viper heart Zellen (VH2) bei 28 °C isoliert werden. Der zytopathische Effekt (CPE) äußerte sich in Zellhypertrophie, Vakuolisierung und Zelllyse innerhalb von sieben Tagen nach der Inkubation. Eine Überstandspassage der ersten Passage der Bartagamenisolate auf sf-9 Zellen rief einen identischen CPE hervor. PCR-Untersuchungen mit spezifischen Primern für Teile des MCP-Gens von FV-3 ergaben kein PCR-Produkt. Im Gegensatz dazu konnte mit spezifischen Primern für Teile des MCP-Gens von IIV-6, der Typspezies des Genus *Iridovirus*, 500 bp lange PCR-Produkte amplifiziert werden. Diese DNA-Stücke wiesen im Vergleich mit der Nukleotidsequenz von IIV-6 eine 97 %ige und im Vergleich mit GbIV eine 100 %ige Identität auf. Untersuchungen zum Virusproteinprofil und zum Restriktionsfragmentlängenprofil bestätigten diese Übereinstimmung mit GbIV. Beim Verdau viraler DNA mit dem Restriktionsenzym HpaII zeigte sich, dass die DNA dieser Isolate im Gegensatz zu Vertebraten-Iridoviren nicht methyliert ist. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung infizierter VH2-Zellen konnten Ansammlungen von ikosahedralen, Iridovirus-ähnlichen, 139 bis 151 nm großen Partikeln entdeckt werden. Negativ kontrastierte Viruspartikel waren 149 bis 170 nm groß.

Bis 2002 wurden drei weitere dieser Viren aus Echsen isoliert (MARSCHANG et al., 2002). Diese Isolate stammten aus zwei toten Chamäleons (*Chamaeleo quadricornis* und *Chamaeleo hoehnelii*), die beide abgemagert waren und einem grünen Leguan (*Iguana iguana*), der auffällige Hautläsionen hatte. Das Isolat aus dem Helmchamäleon (*Chamaeleo hoehnelii*) (Kapitel 2.3.6) wurde für die Übertragungsversuche dieser Studie eingesetzt. Zytopathogene Agenzien wurden aus der Leber des Vierhornchamäleons (*Chamaeleo quadricornis*) und der Haut des Leguans isoliert. Erste Vergleiche der IIV-Isolate aus den Reptilien basierten vor allem auf Vergleichen von Teilsequenzen des hochkonservierten MCP-Gens. Diese ca. 500 bp langen Sequenzen waren bei allen Reptilienisolaten identisch. Außerdem waren sie zu 100 % mit der entsprechenden Sequenz von GbIV (JUST und ESSBAUER, 2001) identisch. Die Bedeutung der IIV im Krankheitsgeschehen der Reptilien blieb ungeklärt. Es ist unklar, ob der Tod der untersuchten Echsen auf eine Infektion mit Virusvermehrung zurückzuführen ist oder ob eventuell toxische Effekte eine Rolle beim Tod der Tiere gespielt haben.

2.3.6 Bisherige Kenntnisse über das Isolat 100/01

Bei dem in den Übertragungsversuchen dieser Studie eingesetzten Isolat handelt es sich um das Isolat 100/01, das aus der Lunge eines toten Helmchamäleon (*Chamaeleo hoehnelii*) isoliert wurde (MARSCHANG et al., 2002). Das Chamäleon war bei der Untersuchung tot und stark abgemagert. Aus Lunge, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere und Milz konnten zytopathogene Agenzien isoliert werden. Die Isolate verursachten einen CPE in zwei verschiedenen Zelllinien (TH-1 und HEF). Die isolierten Viren wurden aufgrund ihrer Morphologie und Größe im EM, sowie ihrer Sensitivität gegenüber Chloroform und IUDR als mögliche Iridoviren identifiziert. Untersuchungen des Genoms mit verschiedenen Restriktionsenzymen zeigten keine Hinweise auf Methylierung. Vergleiche einer ca. 500 bp langen Sequenz des hochkonservierten MCP-Gens waren mit der entsprechenden Sequenz von GbIV identisch. Vergleiche mit dem MCP-Gen des IIV-6 (der

Typspezies des Genus *Iridovirus*) zeigten eine 97 %ige Übereinstimmung (JUST und ESSBAUER, 2001).

2.4 Fragestellungen der eigenen Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit war es, durch Transmissionsversuche die Pathogenität von aus Echsen isolierten IIV-artigen Viren in Insekten und Echsen zu untersuchen. Zunächst sollten Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* der Familie Gryllidae mit dem Isolat (100/01) infiziert werden, um zu testen, ob sich dieses in lebenden Invertebraten nach oraler Infektion vermehren kann. Mit verschiedenen Methoden sollte anschließend überprüft werden, ob eine Infektion stattgefunden hat und versucht werden, das Virus aus den Grillen zu reisolieren. Im Anschluss daran sollten Echsen der Spezies *Pogona vitticeps* (Bartagamen) der Familie Agamidae durch Verfütterung infizierter Grillen und oraler Verabreichung von Virussuspension des gleichen Isolates infiziert werden, um zu untersuchen, ob sich das Virus in lebenden Echsen vermehren kann. Auch in diesem Versuch sollte mit verschiedenen Methoden überprüft werden, ob eine Infektion stattgefunden hat und ob das Virus aus den Bartagamen zu reisolieren ist. Es sollten Methoden entwickelt werden, um eine zügige Diagnose von IIV-Infektionen bei verschiedenen Spezies zu ermöglichen. Dabei sollte bestimmt werden, mit welcher Methode die Viren detektiert werden können, sowie in welchen Organen bzw. Tupfern Viren nachgewiesen werden können. Zusätzlich sollte die breite Palette an untersuchten Organen einen Einblick über die mögliche Ausbreitung der Viren im Körper der infizierten Bartagamen geben. Zum Schluss der Untersuchungen sollten möglichst Empfehlungen für die labortechnische Diagnostik dieser Viren ausgesprochen werden. Hierfür sollte zunächst eine Aussage darüber getroffen werden, welche der durchgeführten Methoden zu empfehlen sind und zusätzlich sollte geklärt werden, welche Proben sich für die jeweiligen Untersuchungen eignen.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien

3.1.1 Virologische Untersuchungen

Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃)-Lösung

75 g/l (0,89 M) NaHCO₃ (Merck KGaA, Darmstadt)

Gelöst in Aqua bidestillata.

Penicillin-G-Lösung

60 mg/ml Penicillin-G (1664 U/mg) (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Aqua bidestillata. Die Stammlösung hat eine Konzentration von ca. 100000 U/ml.

Streptomycinsulfat-Lösung

256 mg/ml Streptomycinsulfat (758 U/mg) (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Aqua bidestillata. Die Stammlösung hat eine Konzentration von ca. 190000 U/ml.

Gentamycinsulfat-Lösung

5 mg/ml Gentamycinsulfat (640 U/mg) (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Aqua bidestillata. Die Stammlösung hat eine Konzentration von 3200 U/ml.

Amphotericin B

Amphotericin B (Biochrom AG, Berlin) 250 µg/ml lyophilisiert.

In 5 ml Aqua bidestillata resuspendiert.

L-Glutamin

200 mM L-Glutamin (Biochrom AG, Berlin)

In Aliquots zu 5 ml bei -20 °C aufbewahrt und vor Gebrauch aufgetaut.

Fötale Kälberserum (FKS)

FKS (Biochrom AG, Berlin)

Basal Medium Eagle (BME) mit Earle'schen Salzen

100 ml/l BME-EARLE 10 x (Biochrom AG, Berlin)

29,3 ml/l NaHCO₃-Lösung (0,89 M)

Verdünt in Aqua bidestillata, sterilfiltriert und kühl gelagert. Je nach Verwendung folgende weitere Zutaten:

Tabelle 2: BME Probenmedium

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml
2	Gentamycinsulfat-Lösung	6,4 U/ml
4	Amphotericin B-Lösung	0,5 µg/ml

Tabelle 3: BME Anzuchtmedium

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
100	FKS	10 % (v/v)
10	L-Glutamin	2 mM

Tabelle 4: BME Erhaltungsmedium

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
20	FKS	2 % (v/v)
10	L-Glutamin	2 mM
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml
2	Gentamycinsulfat-Lösung	6,4 U/ml
4	Amphotericin B-Lösung	0,5 µg/ml

Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM)

13,4 g/l DMEM-Pulvermedium mit 4,5 g/l D-Glucose, mit L-Glutamin, ohne NaHCO₃ und ohne Natrium-Pyruvat (Biochrom AG, Berlin)

2,2 g/l NaHCO₃ (Merck KGaA, Darmstadt)

Gelöst in Aqua bidestillata und sterilfiltriert. Je nach Verwendung folgende weitere Zutaten:

Tabelle 5: DMEM Anzuchtmedium

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
100	FKS	10 % (v/v)

Tabelle 6: DMEM Erhaltungsmedium

Menge in ml/l	Zutat	Endkonzentration
20	FKS	2 % (v/v)
2	Penicillin-G-Lösung	200 U/ml
2	Streptomycinsulfat-Lösung	380 U/ml
2	Gentamycinsulfat-Lösung	6,4 U/ml
4	Amphotericin B-Lösung	0,5 µg/ml

Serumfreies Insektenmedium (TC 100 Insect Medium)

Tabelle 7: Medium für Insektenzellen

Menge in ml	Zutat	Endkonzentration
1000	TC 100 Insect Medium (Biochrom AG, Berlin)	-
100	FKS	10 % (v/v)
20	L-Glutamin	4 mM
1	Gentamycinsulfat-Lösung	3,2 U/ml

Trypsin-Versen 0,05 %

8,00 g/l	136 mM	NaCl (Merck KGaA, Darmstadt)
0,20 g/l	3 mM	KCl (Merck KGaA, Darmstadt)
0,20 g/l	1 mM	KH ₂ PO ₄ (Merck KGaA, Darmstadt)
2,31 g/l	6 mM	Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O (Merck KGaA, Darmstadt)
0,10 g/l	0,4 mM	MgSO ₄ x 7 H ₂ O (Merck KGaA, Darmstadt)
0,132 g/l	0,9 mM	CaCl ₂ x 2 H ₂ O (Merck KGaA, Darmstadt)
0,5 g/l		Trypsin-Trockensubstanz (1:250) (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)
1,25 g/l	3 mM	Versen (Titriplex III) (Merck KGaA, Darmstadt)
0,05 g/l	37900 U/l	Streptomycinsulfat (Biochrom AG, Berlin)
0,06 g/l	100000 U/l	Penicillin-G (Biochrom AG, Berlin)

Gelöst in Aqua bidestillata, mit 1 N NaOH auf pH-Wert 7 eingestellt, sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch aufgetaut und bei 4 °C gelagert.

50 x TAE-Puffer für die Agarosegelelektrophorese

242 g/l (0,2 M)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck KGaA, Darmstadt)
57,1 ml/l	Eisessig (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)
18,612 g/l (0,5 M)	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Gelöst in Aqua bidestillata als Stammlösung, bei Raumtemperatur aufbewahrt und zum Gebrauch 1:50 mit Aqua bidestillata verdünnt.

Ethidiumbromid-Lösung

10 g/l Ethidiumbromid (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Unter dem Abzug mit Handschuhen gelöst in Aqua bidestillata und in Aliquots von 1,5 ml abgefüllt. Bei -20 °C dunkel gelagert und zum Gebrauch einzeln aufgetaut und bei Raumtemperatur dunkel gelagert.

2,5 % Agarosegel

2,5 g/l NEEO-Ultra-Qualität Roti®Garose für die DNA/RNA Elektrophorese (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

50 µl/l Ethidiumbromid-Lösung

Gelöst in 1xTAE-Puffer, aufgekocht, in flüssigem Zustand gegossen und vor Gebrauch ca. eine halbe Stunde erstarren lassen.

DNA-Leiter

0,5 µg/µl Fermentas Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot)

Bandengrößen: 1031, 900, 800, 700, 600, **500**, 400, 300, 200, 100 und 80 bp

Bromphenolblau

400 g/l (1,17 M) Saccharose (Merck KGaA, Darmstadt)

2,5 g/l (4 mM) Bromphenolblau Natriumsalz (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Gelöst in Aqua bidestillata.

3.1.2 Histologische Untersuchungen**Bouin´sche Fixier-Lösung**

714,3 ml/l Pikrinsäure (Merck KGaA, Darmstadt)

238,1 ml/l Formalin konzentriert (36 %) (Merck KGaA, Darmstadt)

47,6 ml/l Essigsäure (Merck KGaA, Darmstadt)

Gemischt, durch Rundfilter filtriert und im Kühlschrank gelagert.

Xylol

106,17 g/mol Xylol (Merck KGaA, Darmstadt)

Isopropanol

60,1 g/mol Isopropanol (Merck KGaA, Darmstadt)

Ethanol 99,9 %

Ethanol 99,9 % (Herkommer und Bangerter GmbH & Co, Leinfelden-Echterdingen) in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Aqua bidestillata.

Hämalaun nach Meyer

1,0 g/l Hämatoxylin puriss (Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster)

Unter Rühren in 1l Aqua bidestillata gelöst.

0,2 g/l (1 mM) Natriumjodat ((Merck KGaA, Darmstadt)

50 g/l (105 mM) Aluminiumkaliumsulfat (Merck KGaA, Darmstadt)

50 g/l (302 mM) Chloralhydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

1 g/l (4,8 mM) Citronensäure-Monohydrat (Merck KGaA, Darmstadt)

Zur Reifung einige Wochen dunkel bei Raumtemperatur aufbewahrt. Vor Gebrauch durch Rundfilter filtriert und bis zu einer Woche bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Eosin Stamm-Lösung

10 g/l Eosin (Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster)

Gelöst in Aqua bidestillata, durch Rundfilter filtriert und im Kühlschrank gelagert. Zum Gebrauch 1:10 mit Aqua bidestillata verdünnt und zu 100 ml Farblösung drei Tropfen Eisessig (Merck KGaA, Darmstadt) dazugegeben.

3.1.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen**Cacodylate-Puffer Stamm-Lösung**

42,8 g/l (0,2 M) Natrium-Cacodylsäure (Merck KGaA, Darmstadt)

Gelöst in Aqua bidestillata und mit 1 N HCl (Merck KGaA, Darmstadt) auf pH-Wert 7,4 eingestellt. Zum Gebrauch als 0,1 M Lösung 1:2 mit Aqua bidestillata verdünnt.

Glutaraldehyd

Glutaraldehyd 25 % (Plano GmbH, Wetzlar)

Mit Aqua bidestillata auf gewünschte Konzentration verdünnt.

Paraformaldehyd

80 g/l (2,66 M) Paraformaldehyd (Merck KGaA, Darmstadt)

In 60 °C warmem 0,2 M Cacodylate-Puffer gelöst. Gut gerührt. Tropfenweise 1 N NaOH zugegeben bis Trübung aufgehoben.

Acetatpuffer

8,203 g/l (0,1 M) Natriumacetat (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe)

Gelöst in Aqua bidestillata und mit Essigsäure (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) auf pH-Wert 5 eingestellt.

Osmiumtetroxid (OsO₄) 1 %

20 g/l Osmiumtetroxid kristallin (Plano GmbH, Wetzlar)

Gelöst in Aqua bidestillata und in lichtdichter Flasche aufbewahrt.

Ethanol 99,8 %

Ethanol 99,8 % (v/v) (Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe) in verschiedenen Mischungsverhältnissen mit Aqua bidestillata.

Uranylacetat 6-7 %

60-70 g/l Uranylacetat (Fluka, Deisenhofen)

In 70 % Ethanol suspendiert bis eine gesättigte Lösung entsteht.

Propylenoxid

56,08 g/mol 1,2-Propylenoxid (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg)

Epoxid-Harz-Kombination

23 g	Araldit Cy 212 (Plano GmbH, Wetzlar)
22 g	Dibutyl Pthalate (DDSA) (Plano GmbH, Wetzlar)
1,2 g	N-Benzyl dimethylamine (BDMA) (Plano GmbH, Wetzlar)

Im Kühlschrank gelagert und direkt vor Gebrauch gemischt.

Phosphorwolframsäure

2 % (w/v)	Phosphorwolframsäure (Waldeck GmbH & Co Division Chroma, Münster)
-----------	--

Gelöst in Aqua bidestillata und mit 1 N NaOH auf pH-Wert 7,3 eingestellt.

Färbelösungen für 1 µm Schnitte:**Toluidinblau**

1 % (w/v)	Toluidinblau (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
-----------	---

Gelöst in Aqua bidestillata.

Natriumkarbonat (Na₂CO₃)

2,5 % (w/v)	Natriumkarbonat (Merck KGaA, Darmstadt)
-------------	---

Gelöst in Aqua bidestillata.

Färbelösungen für Kupfergrids:**Uranylacetat**

2 % (w/v)	Uranylacetat (SPI Supplies Division of Structure Probe, Inc., West Chester, USA)
-----------	---

Gelöst in Aqua bidestillata.

Bleinitrat

1,33 g (80,3 mM) Bleinitrat ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) (SPI Supplies Division of Structure Probe, Inc., West Chester, USA)

1,76 g (136 mM) Natriumcitrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$) (Merck KGaA, Darmstadt)

Gelöst in 30 ml für 20 Minuten gekochtes destilliertes Wasser ohne CO_2 und für 30 Minuten alle 5 Minuten vorsichtig gerührt.

8 ml NaOH 1N (Merck KGaA, Darmstadt)

Mit gekochtem destilliertem Wasser auf 50 ml aufgefüllt und luftdicht aufbewahrt.

3.1.4 Sonstige Untersuchungen**33 % Zinksulfat-Lösung**

330 g/l (1,15 M) $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck KGaA, Darmstadt)

Gelöst in Aqua bidestillata.

3.2 Eingesetzte Zelllinien**Terrapene Heart Zellen (TH-1)**

Bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC), CCL 50 (Teddington, Middlesex, UK). Es handelt es sich um eine permanente Zelllinie aus epithelialen Zellen aus dem Herz der Schildkrötenspezies *Terrapene carolina*.

Viper Heart Zellen (VH2)

Bezogen von der ATCC, CCL 140 (Teddington, Middlesex, UK). VH2 ist eine permanente Zelllinie aus fibroblastischen Zellen, die aus dem Herz der Schlangenspezies *Vipera russelli* stammt.

Spodoptera frugiperda Pupal Ovary Zellen (SF-21)

(VAUGHN et al., 1977)

Erhalten von Prof. Dr. rer. nat. Pfitzner, Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim.

3.3 Weitere Materialien und Geräte

3.3.1 Virologische Untersuchungen

Filtrationsvorsätze FP 30/0,45 CA-S	Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel
DNeasy Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappe (25 cm ² , 80 cm ² und 175 cm ²)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
96-Loch-Platten	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Gewebekulturschalen mit Nocken 35 x 10 mm	Greiner Bio-One GmbH, Essen
Mikroskope:	
Inverses Lichtmikroskop Wilovert	Will, Wetzlar
Lichtmikroskop Dialux 20 EB	Leitz, Wetzlar
Stereomikroskop mit Lichtquelle KL 150	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena Schott AG, Mainz
Waagen:	
Analysenwaagen: Sartorius Research R 200 D und Sartorius Basic BA210S	Sartorius AG, Göttingen
Feinwaage Mettler PC 440 Delta Range®	Mettler-Toledo GmbH, Giessen
Ultraschallgerät: Branson Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
Zentrifugen:	
Jouan GR 412	Jouan GmbH, Unterhaching
Tischzentrifuge Eppendorf 5415 D	Eppendorf AG, Hamburg
Brutschränke:	
CB210	Binder GmbH, Tuttlingen
Cytoperm Heraeus	Kendro Laboratory Products, Hanau
Thermoblock: TB1 Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen

Thermocycler:

Peqlab Primus 25

Peqlab Biotechnologie GmbH,
Erlangen

T-Gradient Thermoblock

Biometra GmbH, Göttingen

Gelelektrophoresekammern horizontal:

Agagel Mini Biometra®

Biometra GmbH, Göttingen

Agagel Midi-Wide Biometra®

Biometra GmbH, Göttingen

Elektrophoresenetzgerät Biometra®

Biometra GmbH, Göttingen

Fluo Link Spektrolinker (TM) XL-1000 UV

Spectronics Westbury

Crosslinker

Corporation, New York, USA

3.3.2 Histologische Untersuchungen

Jet-Kassetten

Leica Microsystems Nussloch
GmbH, Nussloch

Rundfilter Typ 3hw

Neolab Migge GmbH,
Heidelberg

Superfrost®-Objektträger

Langenbrinck R.,
Emmendingen

Gewebeinfiltrationsautomat TP 1020

Leica Microsystems Nussloch
GmbH, Nussloch

Paraffinausgießstation EG 1160

Leica Microsystems Nussloch
GmbH, Nussloch

Rotationsmikrotom RM 2135

Leica Microsystems Nussloch
GmbH, Nussloch

Lichtmikroskop Dialux 20 EB

Leitz, Wetzlar

Leica DMLB Lichtmikroskop

Leica Microsystems GmbH,
Wetzlar

Leica DC 300 Videokamera

Leica Microsystems GmbH,
Wetzlar

Adobe Photoshop 5.0

Adobe Systems GmbH,
München

3.3.3 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Einmalhandschuhe Nitril	Kimberly-Clark, Roswell, GA, USA
Rollrand-Schnappdeckelgläser	Roland Vetter Laborbedarf e.K., Ammerbuch
Glasmesser 6,4 mm	EMS, Fort Washington, USA
Glasmesserschneidemaschine	LKB, Bromma 1, Schweden
Mikrotom Reichert Ultracut	Reichert, Wien, Österreich
Objektträger	Menzel Glasbearbeitungs- werk GmbH und Co. KG, Braunschweig
Lichtmikroskop Standard 20	Carl Zeiss Jena GmbH, Jena
Diamantmesser Diatome	Diatome AG, Biel, Schweiz
Formvar / Kohle-Film auf 3,05 mm Cu- Netzchen 300 mesh	Plano GmbH, Wetzlar
Hexagonale Kupfergrids 300 mesh	EMS, Fort Washington, USA
Elektronenmikroskope: EFTEM 912AB	LEO Elektronenmikroskopie GmbH, Oberkochen
EM-100SX mit integrierter Kamera	Jeol LTD, Tokyo, Japan
Elektronenmikroskopiefilm 4489	Kodak GmbH, Stuttgart
D-19 Entwickler verdünnt 1:2	Kodak GmbH, Stuttgart
Fixierer Unifix verdünnt 1:4	Kodak GmbH, Stuttgart
Agfa Arcus 1200 Scanner	Agfa Deutschland Vertriebsgesellschaft mbH & Cie. KG, Köln

3.3.4 Versuche

Saran Gittergewebe	Fugafil-Saran GmbH, Raesfeld
Slee Glovebox	Slee Technik GmbH, Mainz
KorviminZVT + Reptil	WDT, Garbsen
Jaeger-Kunstglucke FB 50M-Reptilien	Jaeger und Pfrommer Brutgerä- bau GmbH, Wächtersbach
Betriebseinheit für Leuchtstoffröhren	Arcadia, Croydon, UK
Arcadia Reflektor	Arcadia, Croydon, UK
Exoterra Leuchtstoffröhre Repti Glo 8.0	Hagen, Holm
Minimum Maximum Thermometer	TFA Dostmann GmbH und Co KG, Wertheim-Reicholzheim
Elektronische Wochenzeitschaltuhr	Inter-Union Technohandel GmbH, Landau
Waage FIF 280	MTC, Mülheim/Ruhr
Wattestäbchen 150 mm	Heiland MED Vertriebsgesellschaft mbH, Hamburg

3.4 Untersuchung der Proben

3.4.1 Virologische Untersuchungsmethoden

3.4.1.1 Zellkulturen

Inkubiert wurden TH-1 und VH2 bei 28 °C in Feuchtigkeits-gesättigter Luft mit einem CO₂-Gehalt von 5 %. Alle vier bis 14 Tage wurden die Zellen mit Trypsin-Versen abgelöst und 1:5 verdünnt, wobei je nach Bedarf Gewebekulturschälchen oder 96-Loch-Platten eingesetzt wurden. Die SF-21-Zellen wurden bei 27 °C inkubiert. Es wurde versucht, sie regelmäßig zu kultivieren und auf Gewebekulturschälchen einzusäen. Für die Untersuchungen der ersten drei Infektionsversuche mit *Gryllus bimaculatus* und der ersten Virustitrationen wurden TH-1- und VH2-Zellen mit BME versorgt. Die Beurteilung der TH-1-Zellen wurde nach 10 Tagen durch die Alterserscheinungen der Zellen erschwert. Daher wurden die Proben des

ersten Infektionsversuches erneut auf Zellkultur inokuliert, mit DMEM versorgt und die Ergebnisse verglichen. Da die Anzahl der Proben, aus denen Invertebraten-Iridoviren isoliert werden konnten, mit BME und DMEM die gleiche war, wurden die Zellen ab diesem Zeitpunkt mit DMEM versorgt.

Für die Virusisolation wurden nach Entfernen des Mediums 200 µl des Überstandes der aufbereiteten Proben (Kapitel 3.8.1) auf am Vortag vorbereitete 35 mm Petrischälchen, mit einem Monolayer von TH-1- bzw. VH2-Zellen, verimpft. Nach zwei Stunden Inkubation bei 28 °C wurde einmal mit Zellkulturmedium gewaschen, 2 ml Erhaltungsmedium hinzugegeben und für 14 Tage inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen regelmäßig lichtmikroskopisch auf das Auftreten eines CPE untersucht. Falls kein CPE beobachtet werden konnte, wurden die Zellen bei -20 °C tiefgefroren, aufgetaut, abgeschabt, bei 1900 G (3000 U/min) für 15 Minuten zentrifugiert, um Zelldetritus zu entfernen und erneut, auf der gleichen Zelllinie wie zuvor, inokuliert. Es wurden insgesamt drei Passagen durchgeführt, bevor das Ergebnis der Zellkultur für negativ erklärt wurde. Bei den Tupferproben wurde nur eine Blindpassage durchgeführt. Beim Auftreten eines zytopathischen Effekts wurden die Zellen ebenfalls bei -20 °C tiefgefroren, aufgetaut, abgeschabt, zentrifugiert, zweimal passagiert und der Überstand anschließend bei -80 °C aufbewahrt.

Bei dem Versuch der Reisolierung von Viren aus den Proben der Tiere der Infektionsversuche gab es Probleme mit bakterieller Kontamination. Besonders bei den Proben der Grillen und bei den Tupfern war es zum Teil unmöglich, die Zellkulturen zu bewerten. Um diese Probleme zu beheben, wurde eine Erhöhung der Antibiotikakonzentration im Zellkulturmedium sowie Filtration der Proben mit 0,2 und 0,45 µm Filtern ausprobiert. Leider tendieren Iridoviren vor allem bei sehr hohen Titern dazu, grosse Konglomerate von Viruspartikeln zu bilden, die dann herausfiltriert werden können, was zu einem falsch negativen Ergebnis führen kann. Daher wurde nach Möglichkeit auf das Filtern von Proben verzichtet. Falls doch gefiltert

werden musste, wurden wegen der größeren Porengröße 0,45 µm Filter verwendet.

3.4.1.2 Virustitration

Am Vortag wurde eine 96-Loch-Platte mit TH-1- bzw. VH2-Zellen vorbereitet. BME-Erhaltungsmedium (1,8 ml) wurde in Reagenzröhrchen gegeben und eine Verdünnungsreihe von 10^0 bis 10^{-8} vorbereitet. Nach Entfernen des Mediums aus der 96-Loch-Platte wurden in je vier Löcher 100 µl jeder Verdünnungsstufe hinzugegeben und in vier Löcher 100 µl BME-Erhaltungsmedium. Anschließend wurden die Platten 14 Tage bei 28 °C inkubiert und lichtmikroskopisch auf CPE beurteilt. Die KID_{50}/ml berechnete sich mit der Formel nach SPEARMAN und KÄRBER (HIERHOLZER und KILLINGTON, 1996). Bei jedem Infektionsversuch wurde die verwendete Virussuspension titriert. Im Rahmen von Infektionsversuch IV mit *Gryllus bimaculatus* wurden 11 der Proben auf TH-1 mit DMEM titriert.

3.4.1.3 DNA-Präparation

Die DNA-Präparation wurde mit Hilfe des Qiagen DNeasy Tissue Kit für Organproben nach dem Protokoll des Herstellers für die Isolierung von DNA aus tierischen Gewebe durchgeführt, wobei im letzten Schritt nur einmal 100 µl AE-Puffer verwendet wurden. Circa 25 mg des jeweiligen Gewebes wurden in mehreren kleinen Stücken in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit Hilfe von ATL-Puffer und Proteinase K bei 55 °C lysiert. Nach Zugabe von AL-Puffer und einer Inkubation bei 70 °C wurde Ethanol zugegeben, um DNA auszufällen. Mittels Membranen auf Silica-Basis und verschiedener Waschlösungen und Zentrifugationsschritte wurde die ausgefällte DNA in einer der Membranen aufgefangen, gewaschen und schließlich in 100 µl AE-Puffer gelöst. Im Falle von Überstandproben wurden als Ausgangsmaterial 200 µl Überstand verwendet und 20 µl Proteinase K hinzugegeben. Nach der Zugabe von AL-Puffer wurde analog zu den Organproben verfahren.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurde der Arbeitsplatz für die DNA-Präparation räumlich von den Arbeitsplätzen zur Durchführung der PCR getrennt. Die benutzten Pipetten wurden ausschließlich für die DNA-Präparation verwendet und nach Gebrauch für 120 Sekunden in einem Fluo-Link Spektrolinker von beiden Seite dekontaminiert, regelmäßig mit 1 % Peressigsäure (AppliChem, Darmstadt) gereinigt und geeicht. Es wurden nur Pipettenspitzen mit Filter verwendet.

3.4.1.4 PCR

Als PCR wurde zunächst die PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) mit den Primern PCRFOR und PCRREV (Tabelle 8) nach WEBBY und KALMAKOFF (1998) verwendet, um IIV nachzuweisen. Diese PCR amplifiziert einen hochkonservierten 510 bp langen Bereich des MCP-Gens der IIV. Der Mastermix wurde nach dem Protokoll aus Tabelle 9 pipettiert. Im Thermocycler wurde das Temperaturprotokoll aus Tabelle 10 angewandt.

Tabelle 8: Primer der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001)

Primer	Sequenz	Entsprechende Position bei IIV-6 (GenBank NC_003038)
PCRFOR	5'-ACCATTACATTTAATGATTTGG-3'	129804-129789
PCRREV	5'-TTTTGACGTGGTGCAGTTTGAAC-3'	129558-129536

Tabelle 9: Protokoll des Mastermix für die PCR nach JUST und ESSBAUER (2001)

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
Millipore (Aqua bidestillata)	23,25	-
10x Puffer (ohne MgCl ₂)	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	3,0	1,5 mM
dNTP (25 mM)	7,5	3,75 mM
Primer PCRFOR (10 mM)	5,0	1 mM
Primer PCRREV (10 mM)	5,0	1 mM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25	0,025 U/µl
Endvolumen Mastermix	49	
Target (Probe)	1,0	-
Endvolumen Reaktionsansatz	50	

Tabelle 10: Temperaturprotokoll nach JUST und ESSBAUER (2001)

Zeit	Temperatur	Funktion
Stufe 1 für 1 Zyklus		
2 Minuten	94 °C	Denaturierung
2 Minuten	45 °C	Anlagerung der Primer
5 Minuten	72 °C	DNA-Synthese
Stufe 2 für 28 Zyklen		
30 Sekunden	94 °C	Denaturierung
30 Sekunden	45 °C	Anlagerung der Primer
60 Sekunden	72 °C	DNA-Synthese
Stufe 3 für 1 Zyklus		
1 Minute	94 °C	Denaturierung
1 Minute	45 °C	Anlagerung der Primer
5 Minuten	72 °C	DNA-Synthese
∞	4 °C	Gekühlte Lagerung

Da der Vergleich des Virusnachweises mittels Zellkultur und dieser PCR zeigte, dass der Zellkulturnachweis sensitiver war als die PCR, wurde eine nested PCR entwickelt, um IIV in geringeren Konzentrationen nachweisen zu können. Mit Primern für das MCP-Gen (MCP-F1, -F3, -R2, -R4; Tabelle 11) (JAKOB et al., 2002) wurden alle sinnvollen Primerkombinationen mit 10-fachen Reihenverdünnungen von Reptilien-IIV getestet, um die Sensitivität der einzelnen PCRs zu bestimmen. Das sensitivste nested PCR-System (IIV-MCP-F1 und -R4 / -F3 und -R2) wurde anschließend für die weiteren Untersuchungen eingesetzt. Diese PCR amplifiziert im nested Schritt einen hochkonservierten 243 bp langen Bereich des MCP-Gens der IIV. Das PCR-Produkt der ersten Runde ist 1043 bp groß. Der Mastermix wurde nach den Protokollen aus Tabelle 12 und 13 pipettiert. Im Thermocycler wurde das Temperaturprotokoll aus Tabelle 14 angewandt.

Tabelle 11: Primer der nested PCR

Primer	Sequenz	Entsprechende Position bei IIV-6 (GenBank NC_003038)
MCP-F1 (ä.P.)	5'-GGTTTCATCGATATCGCCAC-3'	130128-130109
MCP-F3 (i.P.)	5'-GGGCCGGAGATTATTTGTT-3'	129947-129929
MCP-R2 (i.P.)	5'-AGCAGAAACATTTCCAATCAT-3'	129685-129705
MCP-R4 (ä.P.)	5'-GAAAAGTAATCACTGCCCAT-3'	129050-129069

ä.P. = äußerer Primer; i.P. = innerer Primer

Tabelle 12: Protokoll des Mastermix für die 1. Runde der nested PCR

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
Millipore (Aqua bidestillata)	19,25	-
10x Puffer (ohne MgCl ₂)	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	5,0	2,5 mM
dNTP (2 mM)	7,5	0,3 mM
Primer MCP-F1 (10 mM)	4,0	0,8 mM
Primer MCP-R4 (10 mM)	4,0	0,8 mM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25	0,025 U/µl
Endvolumen Mastermix	45	
Target (Probe/DNA)	5,0	-
Endvolumen Reaktionsansatz	50	

Tabelle 13: Protokoll des Mastermix für die 2. Runde der nested PCR

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
Millipore (Aqua bidestillata)	23,25	-
10x Puffer (ohne MgCl ₂)	5,0	1x
MgCl ₂ (25 mM)	5,0	2,5 mM
dNTP (2 mM)	7,5	0,3 mM
Primer MCP-F3 (10 mM)	4,0	0,8 mM
Primer MCP-R2 (10 mM)	4,0	0,8 mM
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,25	0,025 U/µl
Endvolumen Mastermix	49	
Target (Amplikon der 1. Runde)	1,0	-
Endvolumen Reaktionsansatz	50	

Tabelle 14: Temperaturprotokoll für die nested PCR

Zeit	Temperatur	Funktion
Stufe 1 für 1 Zyklus		
5 Minuten	96 °C	Denaturierung
Stufe 2 für 35 Zyklen		
45 Sekunden	95 °C	Denaturierung
45 Sekunden	50 °C	Anlagerung der Primer
90 Sekunden	72 °C	DNA-Synthese
Stufe 3 für 1 Zyklus		
7 Minuten	72 °C	DNA-Synthese
∞	4 °C	Gekühlte Lagerung

Zusätzlich wurde untersucht, ob eine DNA-Präparation des zu untersuchenden Probenüberstandes vor der nested PCR zu besseren Ergebnissen führt und ob es Unterschiede zwischen einem und fünf Mikroliter Template als Ausgangsmaterial für die erste Runde gibt. Bei diesen Untersuchungen wurde von dem Isolat 100/01 Lunge die achte Passage auf TH-1 verwendet und jede PCR zweimal durchgeführt, um die Ergebnisse vergleichen und verifizieren zu können. Anschließend wurde mit jeweils fünf Mikrolitern DNA der siebten Passage ein vierfacher Ansatz der Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-10} untersucht. Als Negativkontrollen wurde DNA von Fettkörpern von Grillen aus unserer IIV-freien Zucht eingesetzt.

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden die Arbeitsplätze für die Herstellung des Mastermixes, die Zugabe der DNA in der ersten Runde und die Zugabe des Amplikons der ersten Runde im nested PCR-Schritt räumlich voneinander und vom Arbeitsplatz der DNA-Präparation getrennt. An jedem Arbeitsplatz standen Pipetten zur Verfügung, die nur für diesen Arbeitsschritt benutzt, regelmäßig mit 1 % Peressigsäure (AppliChem, Darmstadt) gereinigt und geeicht wurden. Es wurden nur Pipettenspitzen mit Filter verwendet. Außerdem wurde an allen Arbeitsplätzen nach Benutzung UV-Licht zur Dekontamination eingesetzt. Die Ständer für die Proben wurden nach Gebrauch für mindestens eine halbe Stunde in 1 % (v/v) VennoTM Vet1 super (Menno Chemie-Vertrieb, Norderstedt) eingeweicht, mit klarem Wasser

abgespült, getrocknet und jede Seite für 300 Sekunden in einem Fluo-Link Spektrolinker mit UV-Licht dekontaminiert.

3.4.1.5 Gelelektrophorese

Ein 2,5 %iges Agarosegel mit Ethidiumbromid wurde nach dem Erstarren, die Slots am Minuspol, in die Elektrophoresekammer eingelegt und mit TAE-Puffer bedeckt. Die Proben wurden im Anschluss an die PCR auf das Gel aufgetragen, indem von einem Gemisch aus einem Mikroliter Bromphenolblau und 10 µl Probe 10 µl in ein Slot gegeben wurden. Außerdem wurden pro Reihe in ein Slot fünf Mikroliter 100 bp DNA-Leiter gegeben, um später einen Größenvergleich für die Banden zu haben. Eine Spannung von ca. 65 kV wurde über ca. eine halbe Stunde angelegt und das Gel anschließend unter UV-Licht bei 312 nm betrachtet, ausgewertet und fotografiert.

3.4.1.6 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden von DVM, MSc Tibor Papp am Institut für Umwelt und Tierhygiene der Universität Hohenheim durchgeführt. Zur Verifizierung der PCR-Ergebnisse wurden einige PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, ausgeschnitten und mit einem Invitek-Kit aufgereinigt. Direktes Sequenzieren der purifizierten oder verdünnten PCR-Produkte war beim Einsatz der inneren Primer MCP-F3 und -R2 erfolgreich, konnte aber nicht mit den äußeren Primern MCP-F1 und -R4 durchgeführt werden. Die Sequenzierungen wurden in einem ABIPrism310 Kapillarsequenzierer mit dem Taq Dideoxy Terminator System nach dem Protokoll des Herstellers (Applied Biosystems) durchgeführt. Die Proben wurden mit dem 5.1 DNA Sequencer Data Analysis Programm und dem Staden Program Package Version 1.6.0 (STADEN, 1996) bearbeitet. Nukleotid- und Proteindatenbanken wurden mit BLASTN und BLASTX bei www.ncbi.nih.gov (ALTSCHUL et al., 1990) untersucht. In einem Alignment wurden die Nukleotidsequenzen miteinander und mit entsprechenden

Sequenzen aus GenBank mit dem BioEdit Sequence Alignment Editor Programm (HALL, 1999) verglichen.

3.4.2 In-situ-Hybridisierung (ISH)

Die In-situ-Hybridisierungen wurden von Prof. Dr. med. vet. Jens P. Teifke, Dipl. ACVP, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems durchgeführt. Die für die In-situ-Hybridisierungen verwendeten IIV-MCP-spezifischen Digoxigenin-dUTP (DIG)-markierten Sonden stellte DVM, MSc Tibor Papp am Institut für Umwelt und Tierhygiene der Universität Hohenheim mit der von EMANUEL (1991) beschriebenen Methode her. Dazu verwendete Herr Papp den DIG DNA Labeling Mix (10x konzentriert; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und die Primer PCRFOR und PCRREV (Tabelle 08) für die 510 bp lange Sonde und die Primer MCP-F3 und MCP-R2 (Tabelle 11) für die 243 bp lange Sonde. Zu Beginn wurden einige Fettkörperproben von Grillen (mit dem Isolat 100/01 infizierte Tiere und Negativkontrolltiere) mit beiden Sonden untersucht. Da mit beiden Sonden die gleichen Ergebnisse erhalten wurden, wurden die Fettkörperproben der untersuchten Grillen aus den Infektionsversuchen I bis III mit der kürzeren Sonde untersucht. Die untersuchten Organproben der Bartagamen wurden mit beiden Sonden untersucht.

3.5 Untersuchte Proben

Bei den untersuchten Proben handelte es sich um Fettkörper oder Kopfproben von Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* aus der Familie der Gryllidae. Es wurden drei Infektionsversuche mit je 30 Grillen durchgeführt. Außerdem wurde ein weiterer Versuch vollzogen, um 72 infizierte Grillen zur Verfütterung an die Bartagamen zu gewinnen und regelmäßig Grillen aus der Zucht auf IIV-Freiheit überprüft.

Außerdem wurden Organ- und/oder Tupferproben von Bartagamen der Spezies *Pogona vitticeps* aus der Familie der Agamidae gewonnen. Von den

zwei Elterntierpaaren der am Institut für Umwelt- und Tierhygiene ausgebrüteten Bartagamen wurden ein- bis sechsmal Rachen- und Kloakentupferproben und ein- bis dreimal Kotproben gewonnen. Den Bartagamen wurden vor Versuchsbeginn zweimal Tupferproben entnommen und mit der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) untersucht. Außerdem wurde der Kot siebenmal auf Endoparasiteneier untersucht. Im Infektionsversuch mit den Echsen wurden 10 Tieren eingesetzt. Von allen Bartagamen wurden nach Möglichkeit Proben von Gehirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere, Gonaden, Fettkörper und Haut gewonnen. Außerdem wurden während des Versuches regelmäßig Rachen- und Kloakentupferproben entnommen und untersucht. Von weiteren zwei Bartagamen aus der Reservegruppe wurden im Anschluss an den Hauptversuch die oben genannten 13 Organproben gewonnen. Außerdem wurde 2005 erneut ein Gelege von den Elterntieren der Echsen des Infektionsversuches bezogen, um Eier vor dem Schlupf virologisch auf Iridoviren untersuchen zu können.

3.6 Proben aus der Routinediagnostik

Im virologischen Labor des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim wurden 2003 und 2004 im Laufe der Routinediagnostik Proben von zwei verschiedenen Bartagamenzüchtern untersucht.

Aus dem ersten Bestand (Bestand A) schickte der behandelnde Tierarzt Rachen- und Kloakentupfer einer Bartagame mit *Opisthotonus* zur virologischen Untersuchung ein. Das Tier ist einige Wochen später gestorben. Die Tupfer wurden auf TH-1- und VH2-Zellkulturen untersucht. Außerdem wurde der Zellkulturüberstand der dritten Passage auf TH-1 nach DNA-Präparation mit der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) untersucht. Später wurden die Proben auch mit der entwickelten nested PCR untersucht. Das PCR-Produkt wurde sequenziert und die erhaltene Nukleotidsequenz mit der entsprechenden Sequenz des *Gryllus bimaculatus*

Iridovirus und des Isolates 100/01 verglichen. Vom Überstand der vierten Passage des Rachtupfers auf TH-1 wurden zwei Grids für die elektronenmikroskopische Untersuchung angefertigt.

Im zweiten Bestand (Bestand B) verlor 2003 ein Bartagamenzüchter 72 seiner ca. 90 Nachzuchttiere. Die Tiere waren bis zum Schlupf bei 29,2 °C im Inkubator bebrütet worden. Die Schlupfrate lag zwischen 96 und 97 % und das Verhältnis männlich zu weiblich zwischen 50:50 und 40:60. Nach zunächst normaler Entwicklung waren die betroffenen Tiere plötzlich apathisch und dann, kurz vor dem Tod, hyperaktiv. Im Laufe des Todeskampfes kam es bei vielen Tieren zu Darmentleerung und Zungenvorfall. Die gestorbenen Tiere wurden alle nicht älter als zwei bis drei Monate. In dem Bestand lag die Luftfeuchtigkeit bei 50 %, die Umgebungstemperatur im Terrarium am wärmsten Punkt zwischen 24 und 27 °C und unter den Spotstrahlern lokal bei 37 bis 38 °C. Der Züchter hatte in den Jahren zuvor und in den zwei Jahren danach keinerlei Probleme. Bei den Heimchen (*Acheta domestica*), die zur Fütterung der Bartagamen gezüchtet wurden, konnte eine zunehmende Mortalität beobachtet werden. Der Züchter schickte insgesamt drei Heimchen (Tagebuchnummer 52/03) und acht Jungtiere (Tagebuchnummer 64/03, 65/03 und 66/03 und Tagebuchnummer 08/04 Tier eins bis fünf (08/01/04 bis 08/05/04)) zur virologischen Untersuchung ein. Die juvenilen Bartagamen waren alle zuvor für bis zu ca. sechs Monaten bei dem Züchter eingefroren gewesen.

Die eingesandten Heimchen wurden komplett in BME-Probenmedium gegeben, mit Ultraschall behandelt (Duty Cycle 30, Outputstyle 10, 3 Impulse bei 30 %) und bei 1900 G (3000 U/min) für 15 Minuten zentrifugiert, um den Zelldetritus zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und auf TH-1- und VH2-Zellkulturen untersucht. Der Überstand der fünften Passage auf TH-1 wurde nach DNA-Präparation mit der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) untersucht und je ein Grid für die Elektronenmikroskopie angefertigt (Kapitel 3.8.3.2) und im EM untersucht. Später wurden die Proben auch mit

der entwickelten nested PCR untersucht. Das PCR-Produkt wurde sequenziert und die erhaltene Nukleotidsequenz mit der entsprechenden Sequenz des *Gryllus bimaculatus* Iridovirus und des Isolates 100/01 verglichen.

Die Bartagamen wurden seziert. Dabei wurden nach Möglichkeit Proben von Gehirn, Zunge, Lunge, Herz, Magen, Dünndarm und Leber gewonnen und auf TH-1- und VH2-Zellkulturen untersucht. Zudem wurde der Überstand der Organproben nach DNA-Präparation mit der nested PCR untersucht. Von Bartagame 64/03 wurde von dem Überstand der Dünndarmprobe und von Bartagame 66/03 wurde von der Zungenprobe der ersten Passage auf VH2 ein Grid hergestellt (Kapitel 3.8.3.2) und elektronenmikroskopisch untersucht.

3.7 Übertragungsversuche

Um die Pathogenität des aus einem Chamäleon isolierten IIV (Isolat 100/01) für Grillen und Echsen zu überprüfen, wurden zunächst Übertragungsversuche mit Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* durchgeführt. Anschließend wurde Bartagamen (*Pogona vitticeps*) oral virushaltiger Zellkulturüberstand und infizierte Grillen verabreicht.

3.7.1 *Gryllus bimaculatus* (Zweifleckgrillen)

Zweifleckgrillen (auch Mittelmeergrillen genannt) stammen aus dem Mittelmeerraum, sind mittelgroße Insekten mit dickem Kopf und Hinterextremitäten, die zu kräftigen Sprungbeinen umgestaltet sind mit denen sie mäßig springen können. Sie gehören zu der Familie Gryllidae (Überordnung Orthopteroidea (Geradflügler), Ordnung Saltatoria (Heuschrecken), Unterordnung Ensifera (Langfühlerschrecken)). Zweifleckgrillen haben ausgewachsen eine Länge von ca. 30 – 35 mm und eine Dicke von ca. 12 – 15 mm. Die Grundfärbung der Grillen ist schwarz. Die Weibchen haben schwarzbraune und die Männchen goldbraune derbe Vorderflügel, die am Ansatz zwei helle Flecken aufweisen (bimaculatus =

zweifleckt). Zweifleckgrillen benötigen eine Haltungstemperatur von ca. 27 °C und ca. 50 - 60 % Luftfeuchtigkeit. Die Grillen ernähren sich pflanzlich und tierisch mit einem Proteinanteil von ca. 30 %. Bei geringerem Proteinanteil oder Überbelegung kommt es vermehrt zu Kannibalismus. Die männlichen Zweifleckgrillen können zirpen. Die weiblichen Zweifleckgrillen haben einen Ovipositor (Ei-Lege-Bohrer). Mit diesem legen sie die Eier einzeln ins Erdreich ab. Nach 12 bzw. 8 Tagen bei 25 °C bzw. 30 – 33 °C schlüpfen die Larven, die für ihre Entwicklung 8 bzw. 5 - 6 Wochen benötigen (FRIEDERICH und VOLLAND, 1998).

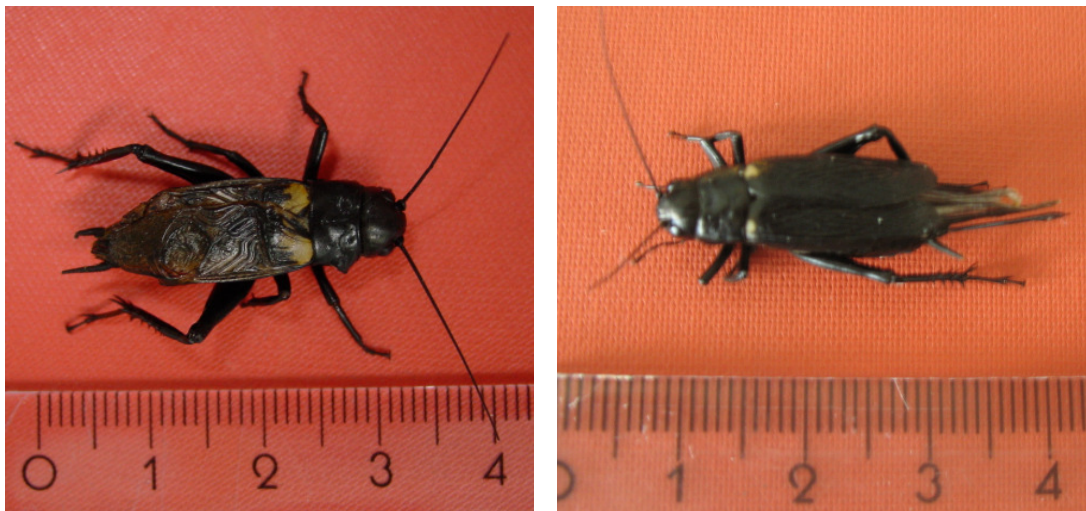


Abbildung 1: Männliche (links) und weibliche (rechts) *Gryllus bimaculatus* aus eigener Zucht

3.7.1.1 Etablierung einer IIV-freien Grillenzucht der Spezies *Gryllus bimaculatus*

Um IIV-freie Insekten zur Verfügung zu haben, wurde am Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim eine IIV-freie Grillenzucht etabliert, die keinen Kontakt zu anderen Insektenzuchten hatte. Der Grundstock an Tieren hierfür wurde freundlicherweise von Frau Dr. Regina Kleespies, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft (BBA), Darmstadt, aus der IIV-freien Zucht der BBA zur Verfügung gestellt. Die Tiere wurden in einem separaten Raum, getrennt von den Laboreinrichtungen, gehalten. Um jeglichen Kontakt der Grillenzucht mit anderen Insekten zu unterbinden und um eine IIV-freie Zucht zu bewahren, wurden alle Fugen des Raumes mit Silikon und Klebeband abgedichtet und die Lüftungen mit Saran Gittergewebe mit einer Fadenstärke von 0,3 mm und einer lichten Maschenweite von 0,95 mm bespannt. Als eine Art Schleuse wurde um die Käfige der Grillen, die auch mit Saran Gittergewebe bespannt wurden, ein großer begehbare Käfig aus Saran Gittergewebe gebaut. In dem Raum und dem begehbaren Käfig wurden Klebefallen für Insekten aufgestellt, um kontrollieren zu können, dass wildlebende Insekten keinen Zutritt bzw. Zuflug hatten. Die Grillen wurden mit Obst und Gemüse als Frischfutter und Matzinger Hundeflocken[®] (Nestlé Purina Pet Care, Euskirchen) oder TetraMin[®] Hauptfutter (Tetra, Melle) als Proteingrundlage gefüttert. Wasser stand ad libitum zur Verfügung. Zur Aufrechterhaltung der Zucht wurde die Temperatur tagsüber möglichst um 27 °C gehalten. Am Institut für Umwelt- und Tierhygiene wurde die Zucht zu Beginn durch tägliche Beobachtung und Untersuchung gestorbener Grillen mittels PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) und TH-1- und VH2-Zellkulturen überprüft. Später wurden von jeder Zuchtgruppe zwei Tiere bei -20 °C tiefgekühlt und nach Bedarf als Negativkontrollen für die DNA-Präparation und die nested PCR verwendet.

3.7.1.2 Infektion von *Gryllus bimaculatus* mit einem IIV-artigen Virus aus einem *Chamaeleo hoehnelii* (Helmchamäleon)

Der Infektionsversuch mit den Grillen wurde in Anlehnung an JAKOB et al. (2002) durchgeführt. Dabei wurde die Infektion durch Dippen gewählt, da damit eine höhere Infektionsrate erzielt wurde als durch Fütterung. Es wurden jeweils 30 subadulte Grillen einer Zuchtgruppe verwendet. Davon wurden 20 Grillen für ca. fünfzehn Sekunden in Virussuspension des Iridovirusisolates 100/01 mit einer KID_{50}/ml von mindestens $10^{6,25}$ gedippt. Zehn Grillen wurden als Negativkontrollen eingesetzt und in nicht infektiösen Zellkulturüberstand getaucht. Um ein Entkommen der Grillen beim Füttern zu verhindern, wurden die infizierten Grillen in einer Glove Box und die Kontrolltiere in einem Terrarium gehalten. Beide Gruppen wurden einige Meter voneinander entfernt im selben Raum untergebracht. Alle Grillen wurden einzeln gehalten, um eine Infektion von Tier zu Tier sowie Kannibalismus zu vermeiden. Die Einzeltierkäfige bestanden aus Plastikbehältnissen (500 ml Volumen) mit Luftlöchern im Deckel. Die Grillen wurden jeden Tag kontrolliert und der Temperaturverlauf regelmäßig mit einem Minimum-Maximum-Thermometer gemessen und protokolliert. Gestorbene Grillen wurden seziiert und ihnen wurden Proben aus dem Fettkörper entnommen. Bei Versuchsende wurden die noch lebenden Grillen im Kühlschrank gekühlt, dekapitiert und ihnen ebenfalls Fettkörperproben entnommen. Um die Fettkörperproben besser identifizieren zu können, wurde die Sektion unter einem Stereomikroskop durchgeführt. Falls die Autolyse der Grillen zu weit fortgeschritten war, so dass eine eindeutige Zuordnung der Organe nicht mehr möglich war, wurden Proben entnommen, die nach Farbe, Konsistenz und Lage am ehesten dem Fettkörper entsprachen.

Der Infektionsversuch I wurde am 06.05.2004 begonnen und lief über 72 Tage bis zum 16.07.2005. Die Grillen wurden in Virussuspension des Iridovirusisolates 100/01 mit einer KID_{50}/ml von $10^{7,25}$ gedippt. Bei den Grillen von Infektionsversuch I wurden alle Untersuchungsmethoden (Zellkultur,

nested PCR, Histologie, ISH und Elektronenmikroskopie) parallel durchgeführt. Alle auf Zellkultur untersuchten Proben mussten in diesem Versuch aufgrund der bakteriellen Kontamination mit 0,45 µm Filtern gefiltert werden.

Der zweite Infektionsversuch wurde am 22.07.2004 begonnen und lief über 51 Tage bis zum 10.09.2005. Die Grillen wurden in Virussuspension des Iridovirusisolates 100/01 mit einer KID_{50}/ml von $10^{6,5}$ gedippt. Bei allen Grillen vom Infektionsversuch II wurden die Proben auf Zellkultur mit BME und mittels nested PCR untersucht. Die Proben für die Zellkultur mussten auch in diesem Versuch aufgrund der bakteriellen Kontamination alle mit 0,45 µm Filtern gefiltert werden. Für die Histologie, die ISH und die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden einzelne Proben ausgewählt. Histologisch wurden die Proben von sieben infizierten Tieren (IT) (IT 02, IT 06, IT 08, IT 10, IT 12, IT 15 und IT 18) und drei Kontrolltieren (KT) (KT 03, KT 06 und KT 10) untersucht. In der ISH wurden die Proben von vier infizierten Grillen (IT 06, IT 08, IT 10 und IT 15) und drei Kontrollgrillen (KT 03, KT 06 und KT 10) untersucht. Elektronenmikroskopisch wurden drei Proben von infizierten Grillen (IT 06, IT 08 und IT 10) untersucht. Von der Grille IT 15 konnte in der Sektion keine Probe für die Elektronenmikroskopie entnommen werden.

Der dritte Infektionsversuch wurde am 22.10.2004 begonnen und lief über 50 Tage bis zum 10.12.2005. Die Grillen wurden in Virussuspension des Iridovirusisolates 100/01 mit einer KID_{50}/ml von $10^{6,25}$ gedippt. Bei allen Grillen von Infektionsversuch III wurden die Proben auf Zellkultur mit BME und mittels nested PCR untersucht. Aufgrund der Annahme, dass das Zellkulturergebnis der Grille IT 07 im zweiten Infektionsversuch durch das Filtrieren der Probe verfälscht wurde, wurde in diesem Versuch nach Möglichkeit auf das Filtrieren verzichtet. Um die Ergebnisse der nested PCR zu überprüfen, wurden Amplikons von zwei Proben sequenziert und mit der entsprechenden Nukleotidsequenz des MCP-Gens des eingesetzten Isolates

100/01 verglichen. Für die Histologie, die ISH und die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden einzelne Proben ausgewählt. Histologisch wurden die Proben von 15 infizierten Grillen (IT 01, IT 02, IT 03, IT 04, IT 06, IT 08, IT 09, IT 11, IT 14, IT 15, IT 16, IT 17, IT 18, IT 19 und IT 20) und sechs Kontrollgrillen (KT 03, KT 04, KT 05, KT 07, KT 08 und KT 10) untersucht. In der ISH wurden die Proben von sieben infizierten Grillen (IT 08, IT 11, IT 14, IT 15, IT 16, IT 17 und IT 20) und einer Kontrollgrille (KT 07) untersucht. Elektronenmikroskopisch wurden sechs Proben von infizierten Grillen (IT 08, IT 11, IT 14, IT 15, IT 16, und IT 20) untersucht. Von der Grille IT 17 konnte in der Sektion keine Probe für die Elektronenmikroskopie entnommen werden.

3.7.1.3 Infektion von *Gryllus bimaculatus* für den Übertragungsversuch mit *Pogona vitticeps*

Da die Anzahl an IIV-positiven Grillen in den drei Infektionsversuchen sehr unterschiedlich war, konnte man keinen bestimmten Anteil an Positiven pro 20 infizierten Grillen festlegen. Um möglichst viele IIV-positive Grillen für den Infektionsversuch mit Bartagamen zu gewinnen, wurden am 23.12.2004 alle zu diesem Zeitpunkt verfügbaren Grillen wie für einen Infektionsversuch infiziert, aber im Anschluss daran in Großgruppen gehalten. Der Versuch lief über 57 Tage bis zum 17.02.2005. Die Großgruppen wurden täglich kontrolliert und die toten Grillen seziiert. Nach Möglichkeit wurde nur der Kopf als Probe abgetrennt. Falls dies nicht möglich war, wurde eine geringe Menge an Fettkörper als Probe entnommen. Die restlichen Körper wurden für die Infektion der Bartagamen bei -80 °C gesammelt. Die Proben wurden auf TH-1-Zellkultur mit DMEM-Erhaltungsmedium auf Virusgehalt untersucht. Von den positiven Proben wurden 11 auf TH-1 titriert. In dem Infektionsversuch mit Bartagamen wurden nur Grillen eingesetzt, die auf TH-1 zu einem CPE führten.

3.7.2 *Pogona vitticeps* (Bartagamen)

Bartagamen stammen ursprünglich aus Australien und bewohnen dort Halbwüsten, Steppen, Baumsteppen, lichte Trockenwälder und tropenfeuchte Biotope. Bartagamen zählen innerhalb der Echsen (Unterordnung Sauria) zu den Agamen (Familie Agamidae). Charakteristisch ist die auffällig kräftige Kopfbestachelung und die in unterschiedlichem Maße aufstellbare und schwarz färbbare Kehle, bzw. der „Bart“, dem die Gattung *Pogona* (griechisch: Bart) auch ihren Namen verdankt. Die Farbe und Zeichnung variiert von grau, graubraun, braun, beige bis zu rot, die sie unter anderem zur Thermoregulation wechseln können. Bartagamen pflanzen sich ovipar fort. Die Gelegegröße variiert zwischen fünf und 35 Eiern pro Gelege, wobei während einer Fortpflanzungssaison mehrere Gelege produziert werden. Das Weibchen vergräbt die Eier im Boden und nach einer temperaturabhängigen Inkubationsperiode von ca. 63 - 93 Tagen schlüpfen die Jungtiere (KÖHLER et al., 2003a). Bartagamen sind sogenannte Lauerjäger, die warten bis sich potentielle Beute ihrem Gesichtsfeld nähert. Sie sind omnivor, wobei Jungtiere einen höheren Anteil an tierischer Nahrung zu sich nehmen (KÖHLER et al., 2003b).



Abbildung 2: Männliche *Pogona vitticeps*

3.7.2.1 Herkunft der im Übertragungsversuch eingesetzten *Pogona vitticeps*

Um sicher zu gehen, dass 10 Bartagamen für den Transmissionsversuch zur Verfügung stehen, wurde von zwei verschiedenen Züchtern jeweils ein Gelege bezogen. Gelege I (20 Eier) war zum „Üben“ der Abläufe und als Reserve gedacht. Gelege II (22 Eier) sollte im Infektionsversuch (Kapitel 3.7.2.3) verwendet werden.

Elterntiere:

Bei Paar I waren beide Bartagamen ca. ein Jahr alt und in gutem Ernährungszustand. Das Männchen war um einiges größer als das Weibchen. Ursprünglich waren die Tiere privat gezüchtet und aus dem Zoofachhandel erworben worden. Das Gelege war das dritte im ersten Legejahr. Da das Weibchen für die Spezies *Pogona vitticeps* sehr klein war, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei ihm um ein Tier der Spezies *Pogona henrillawsoni* (Zwergbartagame) handelte.

Bei Paar II waren beide Bartagamen ca. fünf Jahre alt und in gutem Ernährungszustand. Beide Tiere waren ungefähr gleich groß. Sie wurden ursprünglich von einem Privatzüchter erworben. Das Gelege war das erste im Jahr 2004. Der Besitzer fütterte den Tieren vorwiegend pflanzliche Nahrung (Löwenzahn, Apfel, Banane, u.a.) und je nach Angebot argentinische Waldschaben (*Blaptica dubia*) aus eigener Zucht oder zugekaufte Steppengrillen (*Gryllus assimilis*) und Heimchen (*Acheta domesticus*).

Zur Überprüfung des IIV-Infektionsstatus wurden den Elterntieren der Bartagamen Rachen- und Kloakentupfer entnommen. Diese wurden mit den zu diesem Zeitpunkt zur Verfügung stehenden Methoden untersucht (TH-1-, VH2-Zellkultur und PCR nach JUST und ESSBAUER (2001)). Bei negativen Ergebnissen in allen Untersuchungen, wurde von IIV-freien Tieren ausgegangen. Die beiden ersten Gelege wurden im April 2004 getrennt voneinander innerhalb einer Woche nach Ablage, transportiert und bei 28 °C

(KÖHLER, 1997) in einer Jaeger-Kunstglucke FB 50M-Reptilien bebrütet. Beide Gelege befanden sich in derselben Kunstglucke, waren aber in verschiedenen Behältnissen untergebracht. Die Eier wurden täglich kontrolliert. Die Jungtiere aus Gelege I begannen 78 Tage nach der Eiablage zu schlüpfen. Nach sieben Tagen waren 17 Bartagamen geboren. Die Jungtiere aus Gelege II begannen vier Tage nach dem letzten geschlüpften Tier von Gelege I und 69 Tage nach der Eiablage mit dem Schlupf. Nach 11 Tagen waren 11 Bartagamen aus dem Gelege II geschlüpft. Nach dem Schlupf wurden die Jungtiere noch für ein bis zwei Tage in kleinen Plastikbehältern, mit Luftlöchern im Deckel, auf angefeuchteter Küchenrolle im Inkubator gehalten, bis der Dottersack weitgehend aufgebraucht war. Danach wurden sie in zwei Gruppen, nach Gelegen getrennt, in je ein Terrarium umgesiedelt. Die Bartagamen wurden nun ausschließlich mit IIV-negativen Grillen, pflanzlicher Nahrung und Korvimin ZVT+Reptil® gefüttert (KÖHLER et al., 2003b) und täglich kontrolliert. Nach fünf Monaten wurden 10 Bartagamen, die aus den Eiern des Geleges II geschlüpft waren, einzeln gesetzt. Eine Bartagame war inzwischen an den Folgen eines Unfalls gestorben. Die 17 Bartagamen des Geleges I wurden im gleichen Raum wie die negativen Kontrolltiere der Versuchsgruppe, aber in getrennten Terrarien gehalten.

3.7.2.2 Voruntersuchungen an den jungen *Pogona vitticeps*

Zu Beginn der Aufzucht der Bartagamen wurden am 31.08.2004 von allen geschlüpften Tieren Rachen- und Kloakentupfer entnommen und auf Zellkultur und mit der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) untersucht und anschließend entsorgt. Fünfzehn Tage vor Versuchsbeginn (am 16.02.2005) wurden von allen zehn Bartagamen des Geleges II Rachen- und Kloakentupfer (Tupfer I) entnommen. Die Tupfer I wurden mit Hilfe der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) und auf TH-1- und VH2-Zellkulturen untersucht. Nachdem der Infektionsversuch mit den Bartagamen beendet und die nested PCR entwickelt worden war, wurden diese Proben nach einer DNA-Präparation mit der nested PCR untersucht. In der Zwischenzeit

wurden sie bei -80 °C gelagert. Zwei der in der nested PCR erhaltenen Amplikons wurden sequenziert und die erhaltene Sequenz mit der entsprechenden Sequenz von 100/01 verglichen. Außerdem wurden während der Aufzucht von beiden Gelegen siebenmal Kotproben im Flotationsverfahren auf Parasiteneier untersucht.

Direkt vor der Infektion der jungen Bartagamen wurde als erstes Kontrolltier (KT) die Bartagame PV 01 KT mittels einer intramuskulären Injektion Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg) mit einer Dosis von ca. 550 mg/kg und folgender Inhalationsnarkose mit Isofluran (Isofluran-Baxter®, Baxter, Unterschleißheim) anästhesiert und anschließend dekapitiert. Von Gehirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere, Gonaden, Fettkörper und Haut wurden Proben entnommen. Die Organproben der Bartagame PV 01 KT wurden mit der inzwischen von uns entwickelten nested PCR (aber ohne vorherige Präparation der DNA) untersucht. Die Proben wurden außerdem auf TH-1- und VH2-Zellkulturen gebracht. Nach Abschluss der Untersuchungen wurden die Organproben entsorgt. Aufgrund der Ergebnisse der anderen Negativkontrolltiere wurden die Überstände der Organproben von PV 01 KT erneut untersucht. Da keine Organproben mehr vorrätig waren, wurde eine DNA-Präparation von den Überständen durchgeführt und die gewonnene DNA mit der nested PCR untersucht.

3.7.2.2.1 Untersuchung von Kotproben im Flotationsverfahren

Die von den Elterntieren der Bartagamen und den selbst erbrüteten und aufgezogenen Jungtieren gewonnenen Kotproben wurden im Flotationsverfahren mit Zinksulfatlösung untersucht. Dabei wurde eine ca. kirschgroße Probe mit einem Pistill und fünf bis zehn ml 33 %iger Zinksulfatlösung in einer Reibeschale gründlich zu einem Brei verrührt. Das so erhaltene fließfähige Gemisch wurde über ein Teesieb und einen Trichter in ein Reagenzglas gefüllt und mit 33 %iger Zinksulfatlösung aufgefüllt, so dass die Flüssigkeit sich über den Reagenzglasrand nach oben wölbte. Nach

20 Minuten ruhigen Stehens wurde mit einem Deckglas der oberste Tropfen der Flüssigkeitssäule abgenommen und auf einen Objektträger gebracht. Die Probe wurde anschließend meanderförmig bei 100- bis 400-facher Vergrößerung unter einem Dialux 20 EB Mikroskop untersucht.

3.7.2.3 Infektionsversuch mit *Pogona vitticeps*

Der Infektionsversuch mit den Bartagamen wurde am 03.03.2005 begonnen und lief über 84 Tage bzw. 12 Wochen bis zum 25.05.2005. In dem Infektionsversuch wurden die 10 Bartagamen aus Gelege II eingesetzt (Tabelle 15). Zu Beginn des Versuches waren die Jungtiere ca. acht Monate alt. Die Bartagamen wurden in zwei Gruppen geteilt. Die infizierte Gruppe (IG) bestand aus sechs infizierten Tieren (IT), die Kontrollgruppe (KG) aus vier Kontrolltieren (KT). Die Gruppen waren unterschiedlich groß, da die infizierten Bartagamen in zweiwöchigem Abstand und die Kontrolltiere in vierwöchigem Abstand getötet wurden. Das erste Kontrolltier (PV 01 KT) wurde bei Versuchsbeginn am 03.03.2005, bevor die anderen Bartagamen infiziert wurden, euthanasiert. Zwei Wochen später wurde das erste infizierte Tier (PV 02 IT) euthanasiert und weitere zwei Wochen später je ein Kontrolltier (PV 04 KT) und ein infiziertes Tier (PV 03 IT). An den drei Versuchstagen, an denen je eine Bartagame aus beiden Gruppen euthanasiert wurde, handelte es sich um Tiere von ähnlichem Gewicht. Dabei wurde immer zuerst das Kontrolltier euthanasiert, sezirt und diesem die Proben entnommen.

Tabelle 15: Im Infektionsversuch eingesetzte *Pogona vitticeps*
(Infektionsbeginn 03.03.2005)

Name	Bartagame	Geschlecht	Todestag
PV 01 KT	1. Kontrolltier	w	03.03.05
PV 02 IT	1. Infiziertes Tier	m	17.03.05
PV 03 IT	2. Infiziertes Tier	w	31.03.05
PV 04 KT	2. Kontrolltier	w	31.03.05
PV 05 IT	3. Infiziertes Tier	m	14.04.05
PV 06 IT	4. Infiziertes Tier	m	28.04.05
PV 07 KT	3. Kontrolltier	m	28.04.05
PV 08 IT	5. Infiziertes Tier	m	12.05.05
PV 09 IT	6. Infiziertes Tier	w	25.05.05
PV 10 KT	4. Kontrolltier	m	25.05.05

PV = *Pogona vitticeps*; KT = Kontrolltier; IT = infiziertes Tier;
w = weiblich; m = männlich

Eine Infektion der Echsen mittels Futtertieren wurde simuliert. Sechs Bartagamen wurden einmalig, mittels einer Magensonde (Katzenharnkatheter; Heiland, Hamburg), 1 ml Virussuspension des Iridovirusisolates 100/01 mit einer KID_{50}/ml von $10^{6,75}$ verabreicht und jeweils zwei Virus-positive Grillen an sechs aufeinanderfolgenden Tagen (insgesamt 12 infizierte Grillen pro Bartagame) gefüttert. Die drei Negativkontrolltiere erhielten 1 ml Zellkulturmedium ohne Virus und nicht infizierte Grillen aus unserer Zucht. Alle im Versuch befindlichen Bartagamen wurden einzeln in Terrarien und infizierte und nicht infizierte Tiere in zwei getrennten Räumen gehalten. Die Bartagamen wurden bei einer Umgebungstemperatur von mindestens 18,2 °C (nachts) mit Wärmeplätzen bis zu 41,3 °C und UV-Licht gehalten. Wärmelampen und UV-Licht wurden über eine Zeitschaltuhr gesteuert und tagsüber 12 Stunden angeschaltet. Alle Räume wurden nur mit raumeigener Schutzkleidung und Handschuhen betreten, nachdem ein Desinfektionsschuhbad mit 1 % (v/v) VennoTM Vet1 super (Menno Chemie-Vertrieb, Norderstedt) passiert wurde. In den beiden Räumen befanden sich die Terrarien der Bartagamen in je einem großen begehbaren, mit Saran Gittergewebe bespannten Käfig, um den Zugang oder das Entkommen von Invertebraten zu verhindern. Die Jungtiere des Elternpaares I wurden als Reservetiere im gleichen Raum wie die Kontrolltiere gehalten, waren aber

außerhalb des begehbaren Käfigs untergebracht. Die Bartagamen wurden täglich kontrolliert, wobei immer bei den nicht infizierten Bartagamen begonnen wurde. Bei der täglichen Kontrolle wurde gefüttert, frisches Wasser zur Verfügung gestellt und die Terrarien innen mit Wasser befeuchtet. Außerdem wurden klinischer Zustand, Gewicht, Nahrungsaufnahme und der mit einem Minimum-Maximum-Thermometer gemessene Temperaturverlauf protokolliert. Zusätzlich wurden wöchentlich von allen Bartagamen Rachen- und Kloakentupfer entnommen. Alle 14 Tage wurden ein bis zwei Bartagamen (Tabelle 15) mittels einer intramuskulären Injektion Ketaminhydrochlorid (Ursotamin®, Serumwerk Bernburg AG, Bernburg) mit einer Dosis von ca. 850 bis 1400 mg/kg anästhesiert und anschließend dekapitiert. Bei der folgenden Sektion wurden nach Möglichkeit Blut und folgende Organproben gewonnen: Gehirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere, Gonaden, Fettkörper und Haut. Bei der Organentnahme wurde darauf geachtet, dass alle Organe möglichst steril entnommen wurden. Dabei wurde das Besteck nach der Entnahme der einzelnen Organe immer mit Alkohol abgeflammt und anschließend ausreichend abgekühlt. Das Blut wurde nach Zellen und Plasma getrennt bei -80 °C eingefroren.

Alle Organproben wurden auf TH-1- und VH2-Zellkulturen und mit der nested PCR untersucht. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem PCR-Produkt auch um die gesuchte DNA handelt, wurden einige Amplikons sequenziert und die erhaltene Sequenz mit der entsprechenden Region des Isolates 100/01 verglichen. Für die histologischen Untersuchungen, die ISH und die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden einzelne Organproben der Bartagamen ausgewählt. Histopathologisch wurden alle Proben untersucht, die in der nested PCR positiv waren. Als Negativkontrollen wurden hierbei die beiden in der PCR negativen Bartagamen aus dem Infektionsversuch (PV 06 IT und PV 10 KT) und eine Kontrollbartagame aus der Reservegruppe (KTR) (PV 01 KTR) untersucht. Mit der In-situ-Hybridisierung wurden die Organproben Dünndarm, Fettkörper und Haut von

Bartagame PV 02 IT, Trachea, Zunge, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Gonaden und Haut von PV 03 IT, sowie Trachea, Dünndarm und Fettkörper von der Negativkontrollbartagame PV 04 KT untersucht. Elektronenmikroskopisch wurden 11 Proben (PV 02 IT Zunge, Trachea, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere und Haut; PV 03 IT Trachea und Dickdarm; PV 05 IT Dickdarm und Niere) (Tabelle 33 im Anhang) untersucht, die in der nested PCR eine besonders ausgeprägte Bande zeigten, um die Chance zu erhöhen Viruspartikel zu finden.

Von den Tupfern, die während des Versuches von den Bartagamen entnommen wurden (Tabelle 31), wurden nach DNA-Präparation die Tupfer II, IV, VI, VIII, X, XII und XIII mit der nested PCR untersucht (Tabellen 34 und 35 im Anhang). Acht der in der nested PCR erhaltenen Amplikons wurden sequenziert und die dabei erhaltenen Sequenzen mit der entsprechenden Sequenz des Isolates 100/01 verglichen, um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Die Tupfer II bis VI und, nach den Ergebnissen der nested PCR, zusätzlich die in der PCR positiven Tupfer VIII, X und XIII wurden auf TH-1- und VH2-Zellkultur untersucht (Tabellen 36 bis 39 im Anhang). Aufgrund massiver Verkeimung mussten einige Proben der Tupfer II nach Filtration erneut auf TH-1 bzw. VH2 okuliert werden. Da nach der Filtration (im Gegensatz zu einigen unfiltrierten Proben auf der anderen Zelllinie) kein Virus isoliert werden konnte, wurde später auf die Filtration und nach negativen Ergebnissen bei drei aufeinanderfolgenden Tupferentnahmen auf die Untersuchung auf Zellkultur verzichtet

3.7.2.3.1 Blutentnahme bei *Pogona vitticeps*

Blut wurde aus der *Vena cogygea ventralis* am Schwanz mit einer Kanüle Größe 16 (Braun, Melsungen) in eine 5 ml Monovette® mit 0,5 ml Tri-Natriumcitrat-Lösung (0,106 mol/l) als Antikoagulanzen (Sarstedt, Nümbrecht), entnommen. Nach Zentrifugation bei 1500 G (2650 U/min) für 10 Minuten wurden Plasma und Blutkörperchen getrennt bei -80 °C eingefroren.

3.7.2.4 Untersuchungen bei der Reservegruppe der Spezies *Pogona vitticeps*

Um eine Luftübertragung zwischen den infizierten Bartagamen und den Negativkontrollen, die in getrennten Räumen, aber im gleichen Gebäude gehalten wurden, auszuschließen, wurden zwei Bartagamen aus der Reservegruppe Gelege I, die von anderen Elterntieren eines anderen Züchters stammten, getötet und untersucht. Während des Versuches wurden die Reservebartagamen bis auf den Netzkäfig unter den gleichen Bedingungen im selben Raum mit den Kontrollbartagamen des Infektionsversuches gehalten. Zwei dieser Bartagamen (PV 01 KTR und PV 02 KTR) wurden nach Abschluss des Infektionsversuches mit den Bartagamen auf die gleiche Art wie zuvor die Bartagamen des Übertragungsversuches euthanasiert. Die Sektion der Bartagame PV 01 KTR fand 48 Tage nach dem Ende des Infektionsversuches statt. Die Bartagame war ca. ein Jahr und zwei Wochen alt. Bartagame PV 02 KTR wurde 55 Tage nach dem Ende des Infektionsversuches euthanasiert und war ca. ein Jahr und drei Wochen alt. Von beiden Bartagamen wurden Proben von Gehirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere, Gonaden, Fettkörper und Haut gewonnen und nach DNA-Präparation mittels nested PCR untersucht.

3.7.2.5 Weitere virologische Untersuchungen beim Züchter

Nachdem die Untersuchungen der Organproben der Bartagamen mit der nested PCR ergaben, dass möglicherweise alle Bartagamen aus dem Gelege II mit Iridoviren infiziert waren, wurde im Mai 2005 ein weiteres Gelege von den Elterntieren II bezogen. Diese Eier wurden wie die der ersten Bartagamen bebrütet. Nach ca. zehn Wochen, kurz vor dem erwarteten Schlupf der Bartagamen, wurden drei Eier seziiert, die Schalen und die Embryonen nach DNA-Präparation auf Virusgehalt mittels nested PCR untersucht. Zwei Amplikons wurden zur Überprüfung der Spezifität

sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit der entsprechenden Sequenz des Isolates 100/01 verglichen.

Zusätzlich wurden den Elterntieren bei der Abholung der Eier 2005 am 21.05.2005, am 09.08.2005 und am 13.11.2005 erneut Tupfer (Rachen- und Kloakentupferproben) entnommen. Die Proben wurden im Vergleich mit und ohne DNA-Präparation mit der nested PCR getestet und auf TH-1 und VH2-Zellkulturen untersucht. Die Amplikons wurden zur Kontrolle der Spezifität sequenziert und die erhaltenen Sequenzen mit der entsprechenden Sequenz des Isolates 100/01 verglichen. Aufgrund der Ergebnisse der Tupferproben aus 2005 wurden 2006 erneut Tupfer von den Elterntieren gewonnen. Einerseits, um das positive Ergebnis nach Möglichkeit zu bestätigen und andererseits, um herauszufinden, unter welchen Lebensumständen es zur Virusausscheidung bei dem Männchen kommt. Die Tupfer wurden nach der Winterruhe, am 29.03.2006, und nach der ersten Eiablage im Jahr 2006, am 09.05.2006, entnommen und mit und ohne DNA-Präparation mit der nested PCR getestet und auf TH-1 und VH2- Zellkulturen untersucht

Bei der Abholung der Kontroll-Eier am 21.05.2005, als die ersten Tupfer 2005 entnommen wurden, wogen beide Bartagamen-Elterntiere des Geleges II ca. 300 g. Als die zweiten Tupfer 2005 am 09.08.2005 genommen wurden, wogen beide Tiere 290 g und der Züchter wunderte sich, warum besonders das Männchen im Verhältnis zum Weibchen nicht zunahm, obwohl es regelmäßig und reichlich Futter aufnahm. Bei der dritten Tupferprobenentnahme im Jahre 2005 wog das Weibchen 300 g und das Männchen nur noch 250 g. Der Besitzer hatte beide Tiere seit einiger Zeit als Vorbereitung auf die Winterruhe restriktiv gefüttert. Es wurde eine Sammelkotprobe aus dem Gehege der beiden Tiere entnommen und diese im Flotationsverfahren auf Endoparasiteneier untersucht. Nach Mitteilung des Ergebnisses der Kotuntersuchung hat der Besitzer trotz Anratens aufgrund der bevorstehenden Winterruhe die Tiere nicht therapiert. Bei der ersten Tupferentnahme im Jahr 2006 am 29.03.2006 wogen beide Tiere 290 g.

Beide Tiere waren agil und munter. Erneut wurde eine Sammelkotprobe aus dem Gehege entnommen und diese im Flotationsverfahren untersucht. Bei der zweiten Tupferprobenentnahme im Jahr 2006 wogen beide Tiere ca. 270 g. Trotz guter Futteraufnahme hatten beide Tiere Gewicht verloren. Die vom Weibchen am 03.05.2006 abgelegten Eier waren von schlechter Qualität.

3.8 Probenkollektion und -aufbereitung

Bei der Sektion der Tiere wurde von den Grillen Fettkörper- oder Kopfproben und bei den Bartagamen Organproben für die virologischen, histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen entnommen. Die für die histologischen Untersuchungen entnommenen und aufbereiteten Proben wurden später auch für die In-situ-Hybridisierungen verwendet.

3.8.1 Probenkollektion und -aufbereitung für virologische Untersuchungen

Die Fettkörper- und Kopfproben der Grillen und die Organe der Bartagamen wurden in mehrere ca. 2 x 2 mm messenden Gewebestücke, die Tupferproben der Bartagamen in toto in 15 ml Zentrifugenröhrchen, die 3 ml BME Zellkulturmedium für Proben enthielten, gegeben. Im Anschluss wurden die Proben mit Ultraschall behandelt (Duty Cycle 30, Outputstyle 10, 3 Impulse bei 30 %) und bei 1900 G (3000 U/min) für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C aufbewahrt. Von allen Tieren im Bartagamenversuch, außer PV 01 KT, wurden zusätzlich Organproben bei -80 °C eingefroren, um für die DNA-Präparation verwendet zu werden und um anschließend mit der nested PCR untersucht zu werden.

3.8.2 Probenkollektion und -aufbereitung für histologische Untersuchungen

Die Organproben wurden für 48 Stunden in Bouin'scher Lösung immersionsfixiert. Im Anschluss wurden die Proben mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe über 24 Stunden in einem Gewebefiltrationsautomaten entwässert und dann in einer Paraffinausgießstation in Paraplast® (Sherwood Medical Co., Saint Louis, Mo., USA) eingebettet. Von jedem Probenblock wurden mittels eines Rotationsmikrotoms drei 3 µm dünne Schnitte für eine Übersichtsfärbung geschnitten und auf Superfrost®-Objektträger aufgezogen. Zur deskriptiven lichtmikroskopischen Auswertung wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung nach dem Protokoll der histologischen Abteilung der Anatomie und Physiologie der Haustiere des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik der Universität Hohenheim durchgeführt. Zunächst wurden die getrockneten Schnitte zweimal für zehn Minuten in Xylol entparaffiniert. Anschließend folgte für je fünf Minuten eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol, 96 %, 96 %, 96 %, 90 %, 80 % und 70 %) und dreimal eine fünfminütige Spülung in Leitungswasser. Nachdem die Schnitte fünf Minuten in Hämalaun nach Meyer gefärbt wurden, wurden sie zehn Minuten fließend in Leitungswasser gewässert und dann für zehn Minuten in Eosin gefärbt. Im Anschluss folgte noch ein dreimaliges kurzes Abspülen in Aqua bidestillata und 30 Sekunden in 80 %-igem Alkohol. Danach folgte zweimalig ein kurzes Spülen in 96 %-igem Alkohol und ein kurzes Spülen in Isopropanol bis sie dreimal für je fünf Minuten in Xylol blieben. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte mit Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt) eingedeckt. Die Untersuchung erfolgte an einem Lichtmikroskop vom Typ Dialux 20 EB. Für die bildliche Dokumentation wurde ein Lichtmikroskop vom Typ DMLB mit einer DC 300 Videokamera und angeschlossenem Computer mit Adobe Photoshop 5.0 verwendet.

3.8.3 Probenkollektion und -aufbereitung für elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden Proben der infizierten Grillen und der zehn Bartagamen des Infektionsversuches gesammelt. Die Fettkörperproben der Grillen wurden für mindestens zwei Stunden in 2,5 %igem Glutaraldehyd fixiert. Die Organproben der Bartagamen wurden für mindestens zwei Stunden in einer Lösung von 2 %igem Paraformaldehyd und 3 %igem Glutaraldehyd in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH-Wert 7,4) bei 4 °C fixiert. Nach der Immersionsfixierung wurden die Proben in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer (pH-Wert 7,4) überführt und bis zu vier Wochen im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden sie dreimal für 10 Minuten in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer gewaschen und in einer 1 %igen Lösung von Osmiumtetroxid in 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer eine Stunde bei 4 °C nachfixiert. Dann wurde ein Waschschrift mit 0,1 M Natrium-Cacodylatpuffer wiederholt und anschließend dreimal mit 0,1 M Acetat-Puffer (pH-Wert 5) gewaschen. Nun folgte die Blockkontrastierung mit einer gesättigten Uranylacetatlösung (5 %ig) in 70 %igem Ethanol für zwei Stunden bei Raumtemperatur, um die Proben dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 95 %, 100 %, 100 %, 100 %) zu dehydrieren. Im Anschluss daran wurden die Proben über Propylenoxid als Intermedium in eine Epoxid-Harz-Kombination gegeben und eingebettet. Nach mindestens 48 Stunden bei 60 °C im Wärmeschrank waren die Blöcke auspolymerisiert und konnten später in Kooperation mit Professor Dr. A. P. Alves de Matos, Dental Medical School (ITB), Universität Lissabon, und Pathological Anatomy Department, Curry Cabral Hospital, Lissabon, Portugal, geschnitten und lichtmikroskopisch und elektronenmikroskopisch betrachtet und beurteilt werden (Kapitel 3.8.3.1). Im Rahmen der Routinediagnostik wurden Grids von Zellkulturüberständen angefertigt (Kapitel 3.8.3.2) und untersucht.

3.8.3.1 EM Untersuchungen von Organproben

Zunächst wurden mit dem Mikrotom und Glasmessern Semischnitte von ca. 1 µm Dicke angefertigt. Diese wurden für einige Sekunden mit einer gefilterten Mischung aus 10 Tropfen 2,5 %igem Natriumkarbonat und einem Tropfen 1 %igem Toluidinblau auf einer Heizplatte gefärbt, unter fließendem Leitungswasser gewaschen, getrocknet und lichtmikroskopisch beurteilt. Das für die weiteren Untersuchungen geeignetste Areal der Probe wurde identifiziert und im Anschluss mit einem Diamantmesser Ultradünnschnitte von ca. 70 bis 100 nm Dicke angefertigt und auf Grids gebracht. Die Grids wurden 30 bis 45 Minuten mit 2 %iger Uranylacetatlösung und drei bis vier Minuten mit Bleinitratlösung gefärbt. Nach dem Trocknen konnten die Grids im JEM-100SX-Elektronenmikroskop bei 80 kV beurteilt werden. Die Dokumentation erfolgte mittels der im EM integrierten Kamera und Elektronenmikroskopiefilmen 4489. Die Filme wurden anschließend mittels 1:2 verdünntem D-19-Entwickler und 1:4 verdünntem Unifix-Fixierer in einer Dunkelkammer entwickelt. Die gewonnenen Negative wurden mit Hilfe eines Agfa-Arcus-1200-Scanner archiviert.

3.8.3.2 EM Untersuchungen von Zellkulturüberstand

Circa 25 µl des unbehandelten virusinfizierten Zellkulturüberstandes wurden auf Parafilm^R M (American National CanTM, Greenwich, CT, USA) pipettiert. Ein Grid mit Pioloformfolie ohne Kohlebedampfung wurde mit der glänzenden Seite nach unten für fünf Minuten auf den Tropfen Überstand gelegt. Nach der Virusadsorption wurde das Grid senkrecht auf Zellstoff stehend getrocknet und für eine Minute auf einen Tropfen Phosphorwolframsäure überführt und kontrastiert. Die Untersuchung erfolgte mit einem Energiefilter-Transmissionselektronenmikroskop (EFTEM) 912 AB. Abbildungen wurden mit der integrierten Slowscan-CCD-Kamera und dazugehöriger Software (ESI-Vision) aufgenommen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Proben aus der Routinediagnostik

Die Untersuchungsergebnisse der Bartagamenproben aus der Routinediagnostik sind in Tabelle 16 dargestellt.

Bestand A:

Aus dem Rachentupfer der Bartagame mit *Opisthotonus* konnten auf TH-1 und VH2 IIV isoliert werden. Der Rachentupfer war auch in der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) positiv. Bei späteren Untersuchungen wurde auch mit der nested PCR ein Amplikon der gesuchten Größe erhalten. Das PCR-Produkt wurde sequenziert und die erhaltene Nukleotidsequenz war zu 100 % mit der entsprechenden Sequenz des *Gryllus bimaculatus* Iridovirus und des Isolates 100/01 identisch. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung vom Zellkulturüberstand konnten Iridovirus-ähnliche Partikel gefunden werden. Der Kloakentupfer war in allen Untersuchungen negativ.

Bestand B:

Aus den drei eingesandten Heimchen (*Acheta domesticus*) konnte auf TH-1- und VH2-Zellen Virus isoliert werden und mit der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) Amplikons der gesuchten Größe amplifiziert werden. Bei späteren Untersuchungen wurde auch mit der nested PCR ein PCR-Produkt der gesuchten Größe amplifiziert. Dieses wurde sequenziert und die erhaltene Nukleotidsequenz war zu 100 % mit der entsprechenden Sequenz des *Gryllus bimaculatus* Iridovirus und des Isolates 100/01 identisch. Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung vom Zellkulturüberstand konnten Iridovirus-ähnliche Partikel gefunden werden.

Die Bartagame mit der Tagebuchnummer 64/03 war das vierte Jungtier aus dem ersten Gelege 2003 des Züchters, wog 11,5 g und war kachektisch. Das Tier hatte keinen Fettkörper. Im Magen konnten Reste von Heimchen gefunden werden. Auf Zellkultur konnten aus Gehirn, Zunge, Lunge, Magen und Dünndarm Iridoviren isoliert werden. In der nested PCR waren die Proben von Gehirn, Zunge, Lunge, Herz, Dünndarm und Leber positiv und die Probe vom Magen schwach positiv. Im Elektronenmikroskop konnten im Überstand der Zellkultur vom Dünndarm Iridovirus-ähnliche Partikel gefunden werden.

Das Tier mit der Tagebuchnummer 65/03 war das achte Jungtier aus dem zweiten Gelege 2003 des Züchters, wog 4,5 g und war ebenfalls kachektisch. Bei der Sektion fielen das Fehlen des Fettkörpers, der gerötete Magen-Darm-Trakt und der leere Darm auf. Proben vom Gehirn konnten bei diesem Tier nicht gewonnen werden. Aus Zunge, Lunge, Herz, Magen, Dünndarm und Leber konnten Iridoviren isoliert werden. In der nested PCR waren die Proben von Zunge, Lunge, Herz, Dünndarm und Leber positiv und die Probe vom Magen schwach positiv.

Die Bartagame mit der Tagebuchnummer 66/03 war das fünfte Jungtier aus dem dritten Gelege 2003 des Züchters, wog 4,0 g und war wie die anderen Tiere kachektisch. Bei der Sektion fielen das Fehlen des Fettkörpers und der gerötete und leere Magen-Darm-Trakt auf. Proben vom Gehirn konnten bei diesem Tier nicht gewonnen werden. Aus Zunge, Lunge und Herz konnten Iridoviren isoliert werden. In der nested PCR waren die Proben von Zunge, Lunge, Herz, Dünndarm und Leber positiv. Im EM konnten im Überstand der Zellkultur von der Zunge Iridovirus-ähnliche Partikel gefunden werden.

Bei der Bartagame mit der Tagebuchnummer 08/01/04, die 5 g wog und kachektisch war, war der Magen bei der Sektion leer. Proben von Gehirn und Magen wurden bei dieser Bartagame nicht gewonnen. In der Zellkultur und der nested PCR konnte kein Virus nachgewiesen werden.

Die Bartagame 08/02/04 wog 4,9 g und war kachektisch. Bei der Sektion fanden sich im Magen vier unverdaute Heimchen und auf der Magen- und Darmschleimhaut punktförmige bis membranöse, weißlich-rötliche nicht ohne Substanzverlust ablösbare Auflagerungen (Enteritis). Proben vom Gehirn konnten bei dieser Bartagame nicht gewonnen werden. Aus Zunge, Magen und Darm konnten Iridoviren isoliert werden. In der nested PCR waren die Proben von Zunge, Magen und Dünndarm positiv.

Die Bartagame 08/03/04 wog 2,7 g und hatte im Magen zwei unverdaute Heimchen. Proben von Gehirn und Magen wurden bei dieser Bartagame nicht gewonnen. In der Zellkultur und der nested PCR konnte kein Virus nachgewiesen werden.

Das Jungtier 08/04/04 wog 2,2 g, war kachektisch und hatte eine kotverschmutzte Kloake. Proben von Gehirn und Magen wurden bei dieser Bartagame nicht gewonnen. In der Zellkultur und der nested PCR konnte kein Virus nachgewiesen werden.

Die Bartagame mit der Tagebuchnummer 08/05/04 wog 2,5 g und hatte in der Sektion einen leeren Magen. Proben von Gehirn und Magen wurden bei dieser Bartagame nicht gewonnen. In der Zellkultur und der nested PCR konnte kein Virus nachgewiesen werden.

Tabelle 16: Ergebnisse der Untersuchungen der Bartagamenproben aus der Routinediagnostik

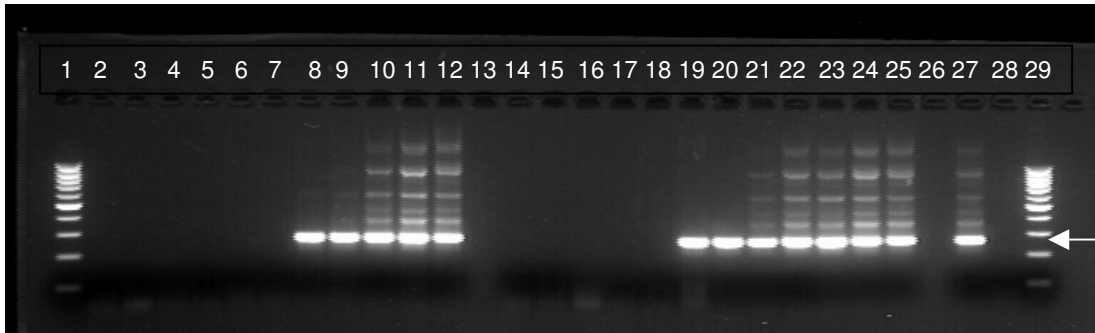
Bestand	TBNr.	N	Ra	Ge	Zu	Lu	He	Ma	Dü	Le	
A	50/03	ZK	+	k.P.							
		PCR	+								
B	64/03	ZK	k.P.	+	+	+	-	+	+	-	
		nPCR		+	+	+	+	(+)	+	+	
	65/03	ZK		k.P.	+	+	+	+	+	+	+
		nPCR		k.P.	+	+	+	+	(+)	+	+
	66/03	ZK		k.P.	+	+	+	-	-	-	-
		nPCR		k.P.	+	+	+	-	-	+	+
	08/01/04	ZK		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-
		nPCR		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-
	08/02/04	ZK		k.P.	+	-	-	-	+	+	-
		nPCR		k.P.	(+)	-	-	-	(+)	+	-
	08/03/04	ZK		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-
		nPCR		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-
	08/04/04	ZK		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-
		nPCR		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-
	08/05/04	ZK		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-
		nPCR		k.P.	-	-	-	-	k.P.	-	-

TBNr. = Tagebuchnummer; N = Nachweismethode; Ra = Rachentupfer; Ge = Gehirn; Zu = Zunge; Lu = Lunge; He = Herz; Ma = Magen; Dü = Dünndarm; Le = Leber; ZK = Zellkultur; PCR = PCR nach Just und Essbauer (2001); nPCR = nested PCR; (+) = schwache Bande in der nested PCR; + = Virus nachgewiesen; - = kein Virus nachgewiesen; k.P. = keine Probe

4.2 Entwicklung der nested PCR

Vergleichende Untersuchungen zur Sensitivität der nested PCR mit Primern nach JAKOB et al. (2002) ergaben, dass sie 100-mal sensitiver ist als die PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) und 10-mal sensitiver als die Zellkultur. Außerdem konnten Unterschiede zwischen Virussuspension und durch DNA-Präparation gewonnene DNA der Virussuspension und zwischen dem Einsatz von einem oder fünf Mikroliter der jeweiligen Probe als Template festgestellt werden. Die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchungen der nested PCR sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Beim Einsatz von einem Mikroliter unbehandelter Virussuspension (ohne DNA Präparation) der achten Passage des Isolates 100/01 konnte bis zu einer

Verdünnung von 10^{-4} (Abbildung 3) ein PCR-Produkt amplifiziert werden. Wenn zuvor eine DNA-Präparation der Virussuspension gemacht wurde, war ein Nachweis einmal bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} und einmal bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} (Abbildung 3) möglich.



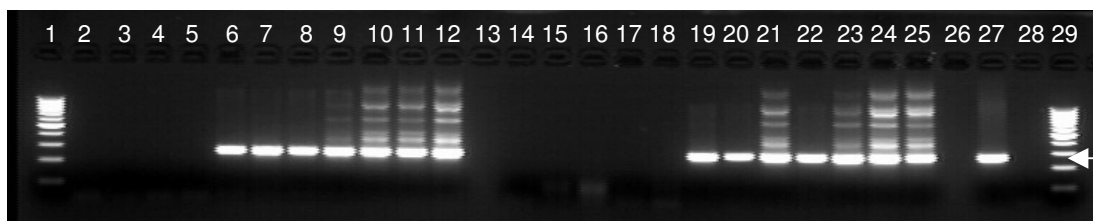
Legende

1 und 29:	100 bp DNA-Ladder	15 bis 25:	DNA der Titrationsreihe 10^{-10}
2 bis 12:	Titrationsreihe 10^{-10} bis 10^0		bis 10^0
	(ohne DNA-Präparation)	26:	leer
13:	NK DNA-Präparation	27:	PK
14:	leer	28:	NK

Abbildung 3: Nested PCR einer Titrationsreihe der 8. Passage auf TH-1 von Isolat 100/01; 1 μ l als Template eingesetzt

Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (\leftarrow).

Bei einem Einsatz von fünf Mikrolitern der gleichen Verdünnungsreihe als Template für die erste Runde konnten bei der unbehandelten Virussuspension bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} (Abbildung 4) und bei der präparierten DNA einmal bis zu einer Verdünnung von 10^{-5} und einmal bis zu einer Verdünnung von 10^{-6} (Abbildung 4) Banden der gesuchten Größe detektiert werden.



Legende

1 und 29:	100 bp DNA-Ladder	15 bis 25:	DNA der Titrationsreihe 10^{-10}
2 bis 12:	Titrationsreihe 10^{-10} bis 10^0 (ohne DNA-Präparation)	26:	leer
13:	NK DNA-Präparation	27:	PK

Abbildung 4: Nested PCR einer Titrationsreihe der 8. Passage auf TH-1 von Isolat 100/01; 5 μ l als Template eingesetzt

Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (\leftarrow).

Tabelle 17: Ergebnisse der nested PCR mit der achten Passage der Titrationsreihe von 100/01

	Original 1 μ l	Original 1 μ l	Original 5 μ l	Original 5 μ l	DNA 1 μ l	DNA 1 μ l	DNA 5 μ l	DNA 5 μ l
10^{-10}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-9}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-8}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-7}	-	-	-	-	-	-	-	-
10^{-6}	-	-	+	+	-	+	-	+
10^{-5}	-	-	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-3}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-2}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^{-1}	+	+	+	+	+	+	+	+
10^0	+	+	+	+	+	+	+	+

Um das sensitivste System zu nutzen, wurden alle weiteren Proben einer DNA-Präparation unterzogen und von der gewonnenen DNA fünf Mikroliter als Template für die nested PCR eingesetzt. Um die Zuverlässigkeit der nested PCR bei geringen DNA Mengen zu überprüfen, wurde ein vierfacher Ansatz der Verdünnungsstufen 10^{-6} bis 10^{-10} der siebten Passage des Isolates 100/01 untersucht. Dabei war 10^{-6} viermal, 10^{-7} dreimal, 10^{-8}

zweimal, 10^{-9} dreimal und 10^{-10} einmal positiv (Tabelle 18). Die Kontrollen in den verschiedenen Versuchen waren unauffällig.

Tabelle 18: Ergebnisse der nested PCR mit der siebten Passage der Titrationsreihe von 100/01

	Ansatz 1	Ansatz 2	Ansatz 3	Ansatz 4
10^{-10}	+	-	-	-
10^{-9}	+	+	-	+
10^{-8}	+	-	-	+
10^{-7}	+	+	-	+
10^{-6}	+	+	+	+

4.3 Infektionsversuche mit *Gryllus bimaculatus*

Insgesamt wurden drei vergleichbare Infektionsversuche (I-III) mit Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* durchgeführt. Die Ergebnisse der verschiedenen angewandten Nachweismethoden der Infektionsversuche I-III sind in den Tabellen 20, 23 und 26 dargestellt. In einem weiteren Infektionsversuch (IV) wurden infizierte Grillen für den Infektionsversuch mit *Pogona vitticeps* gewonnen.

4.3.1 Infektionsversuch I mit *Gryllus bimaculatus*

Die nachfolgende Tabelle 19 zeigt die Auswertung der während des Infektionsversuches I mit *Gryllus bimaculatus* gemessenen Umgebungstemperaturen und Abbildung 5 zeigt deren Verlauf. Die Ergebnisse der verschiedenen angewandten Nachweismethoden des Infektionsversuches I mit *Gryllus bimaculatus* sind in Tabelle 20 dargestellt und deren Zusammenfassung in Tabelle 21.

Tabelle 19: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches I mit *Gryllus bimaculatus*

	Kontrollgruppe		Infizierte Gruppe	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Mittelwert	24,6 °C		23,8 °C	
Minimum	21,1 °C	22,3 °C	21,0 °C	22,3 °C
Maximum	25,6 °C	28,2 °C	24,0 °C	28,1 °C
Stabw.	1,1	1,2	0,8	1,4

Stabw. = Standardabweichung

Der errechnete Mittelwert ergibt sich aus den gemessenen Minimum- und Maximumwerten. Daraus folgt, dass er ungleich der Tagesdurchschnittstemperatur ist. Die Maximaltemperatur von 28,2 °C und die Minimaltemperatur von 21 °C wurden an keinem Tag und in keiner Gruppe über- bzw. unterschritten.

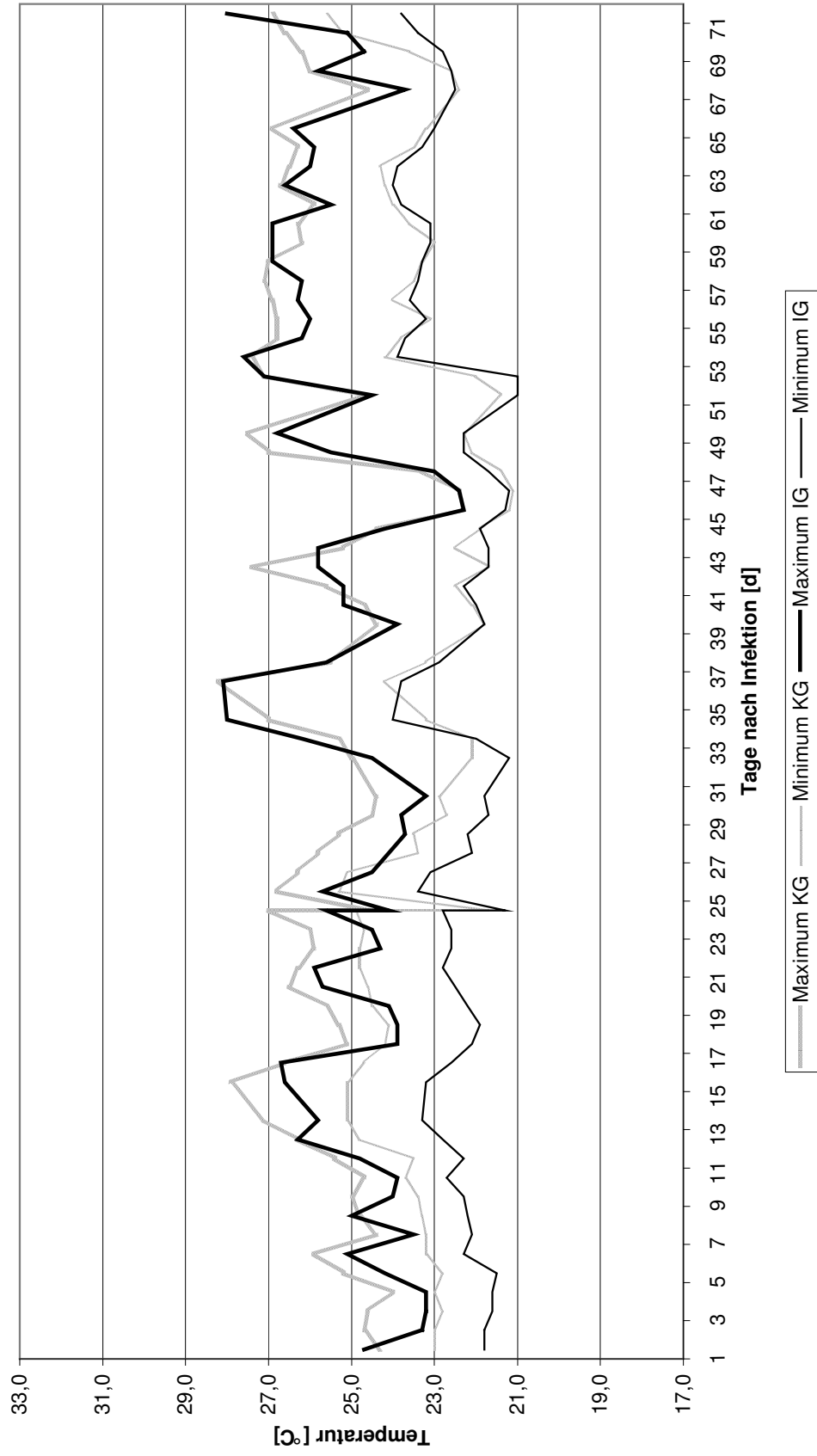


Abbildung 5: Temperaturverlauf des Infektionsversuches I mit *Gryllus bimaculatus*

Bis zum Ende des Versuches waren sieben der zwanzig infizierten Grillen (IT 01, IT 07, IT 09, IT 10, IT 13, IT 14 und IT 19) gestorben und eine (IT 15) wurde vorzeitig euthanasiert. Außerdem war eine der zehn Negativkontrollgrillen (KT 05) verstorben. Während des Versuches hatte die Grille IT 09 am vierten Tag nach der Infektion große Probleme bei der Häutung, die zu Missbildungen am rechten Hinterbein führten. Diese Grille starb am 28. Tag. Bei der Grille IT 15 konnten am 15. Tag nach der Infektion Missbildungen am linken Hinterbein beobachtet werden, die zu erheblichen Bewegungsstörungen führten. Die Grille wurde am 22. Tag euthanasiert. Ab dem 15. Tag erschienen die Abdomen von vier Grillen (IT 01, 02, 10 und 19) aufgetrieben. Bis auf die Grille IT 02 starben diese im Laufe des Versuches. Die Grillen IT 07, IT 13 und IT 14 verstarben plötzlich ohne vorherige Symptome 48, 46 bzw. 28 Tage nach der Infektion. Aus der Kontrollgruppe fehlten der Grille KT 05 nach der Häutung am 30. Tag die Hintergliedmaßen und sie starb am 39. Tag. Die Todesursachen der Kontrollgrille war unbekannt. Ein Zusammenhang mit einer Virusinfektion konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Sektion konnte bei vier Grillen aus der infizierten Gruppe (IT 01, IT 07, IT 10 und IT 12) eine bläulich irisierende Färbung festgestellt werden. Bei einer fünften Grille (IT 18) war diese sehr geringgradig ausgeprägt. Von diesen fünf waren drei Grillen (IT 01, IT 07 und IT 10) im Verlauf des Versuches gestorben.

In der Zellkultur konnte bei sieben infizierten Grillen (IT 01, IT 09, IT 10, IT 12, IT 14, IT 15 und IT 19) sowohl mit BME als auch mit DMEM auf TH-1 und auf VH2 Virus isoliert werden. Mit BME konnten auf TH-1 zusätzlich bei IT 03 und IT 17 und mit DMEM auf VH-2 zusätzlich bei IT 16 und IT 20 Virus isoliert werden. Insgesamt konnte aus 11 der 20 infizierten Grillen (55 %) mit mindestens einer der eingesetzten Zellkulturmethoden Virus isoliert werden. Bei den zehn Negativkontrollgrillen konnte aus keiner Probe Virus isoliert werden.

In der nested PCR konnten bei 15 der 20 infizierten Grillen (75 %) (IT 01, IT 03, IT 05, IT 07, IT 09, IT 10 und IT 12 bis IT 20) und bei keiner der Kontrollgrillen Virus nachgewiesen werden. Alle auf Zellkultur positiven Proben waren auch in der nested PCR positiv.

Bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbten Schnitte von acht infizierten Grillen (IT 01, IT 07, IT 09, IT 10, IT 12, IT 14, IT 15 und IT 19) erschien eine große Zahl der Adipozyten vergrößert. Zahlreiche Adipozyten von unterschiedlicher Größe wiesen in ihrem Zytoplasma eine homogene stark basophile grobschollige Masse auf. Die Probe einer infizierten Grille war nicht auswertbar (IT 13). Bei den Proben der untersuchten Kontrollgrillen (KT 02, KT 06 und KT 07) konnten keine histopathologischen Veränderungen festgestellt werden.

Bei der In-situ-Hybridisierung konnten bei drei infizierten Grillen (IT 01, IT 03 und IT 07) deutliche Signale festgestellt werden. Unter diesen Proben war nur eine Grille, die in allen anderen Untersuchungsmethoden positiv war (IT 01). IT 03 war zusätzlich in der nested PCR und auf TH-1 mit BME positiv. Die infizierte Grille IT 07 war mit allen Methoden außer der Virusisolierung positiv. Keine Signale konnten bei den restlichen Infizierten und den drei untersuchten Negativkontrollgrillen (KT 01 bis KT 03) festgestellt werden.

Bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung waren die acht der 20 Grillen positiv, die auch in den histologischen Untersuchungen Hinweise auf eine Virusinfektion aufwiesen (IT 01, IT 07, IT 09, IT 10, IT 12, IT 14, IT 15 und IT 19). Von einer Probe war der Block nicht schneidbar und diese Probe daher nicht auswertbar (IT 08). Alle im Elektronenmikroskop positiven Proben waren auch in der PCR und bis auf eine auf beiden Zellkulturen positiv. Die parakristallinen Areale bei IT 07 waren im Elektronenmikroskop extrem groß und wurden vermutlich aus der Probe für die Zellkultur herausgefiltert.

Tabelle 20: Übersicht der Ergebnisse des Infektionsversuches I mit *Gryllus bimaculatus*

Tier	Symptome	G/E	Irideszenz	TH-1	VH2	PCR	Histo	EM	ISH
KT 01	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	-
KT 02	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	-
KT 03	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	-
KT 04	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 05	+	G	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 06	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
KT 07	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
KT 08	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 09	-	E	-	-	-	-	n.a.	n.u.	n.u.
KT 10	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 01	+	G	+	+	+	+	+	+	+
IT 02	+	E	-	-	-	-	-	-	-
IT 03	-	E	-	+ B	-	+	-	-	+
IT 04	-	E	-	-	-	-	-	-	-
IT 05	-	E	-	-	-	+	-	-	-
IT 06	-	E	-	-	-	-	-	-	-
IT 07	-	G	+	-	-	+	+	+	+
IT 08	-	E	-	-	-	-	-	n.a.	-
IT 09	+	G	-	+	+	+	+	+	-
IT 10	+	G	+	+	+	+	+	+	-
IT 11	-	E	-	-	-	-	-	-	-
IT 12	-	E	+	+	+	+	+	+	-
IT 13	-	G	-	-	-	+	n.a.	-	-
IT 14	-	G	-	+	+	+	+	+	-
IT 15	+	VE	-	+	+	+	+	+	-
IT 16	-	E	-	-	+ D	+	-	-	k.P.
IT 17	-	E	-	+ B	-	+	-	-	-
IT 18	-	E	(+)	-	-	+	-	-	-
IT 19	+	G	-	+	+	+	+	+	-
IT 20	-	E	-	-	+ D	+	-	-	-

G = gestorben; E = euthanasiert; VE = vorzeitig euthanasiert; + = positives Ergebnis der jeweiligen Nachweismethode; - = negatives Ergebnis der jeweiligen Nachweismethode; (+) = geringgradig ausgeprägte Irideszenz; B = nur mit BME; D = nur mit DMEM; n.u. = nicht untersucht; n.a. = nicht auswertbar; k.P. = keine Probe vorhanden

Die nested PCR war die sensitivste Methode (Kapitel 4.3.4). Sie detektierte zu 75 % positive (15 Grillen) unter den infizierten Grillen, von denen 45 bis 55 % (9 bis 11 Grillen) auch in der Zellkultur positiv waren. Histologisch und elektronenmikroskopisch konnten die gleichen 40 % an Positiven (8 Grillen) ermittelt werden, die bis auf eine Grille mit den Ergebnissen der Zellkultur übereinstimmten. Die 25 % der Grillen (5 Grillen), die eine irisierende Färbung aufwiesen, waren alle auch in der PCR positiv. Bei der In-situ-Hybridisierung waren 15 % der Grillen (3 Grillen) positiv.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden des Infektionsversuches I mit *Gryllus bimaculatus*

Nachweismethode	Prozentsatz an positiven infizierten Grillen	Anzahl positiver infizierter Grillen
Irideszenz	25	5
TH-1- und VH2-Zellkulturen	45 - 55	9 - 11
PCR	75	15
Histo	40	8
EM	40	8
ISH	15	3

4.3.2 Infektionsversuch II mit *Gryllus bimaculatus*

Die nachfolgende Tabelle 22 zeigt die Auswertung der während des Infektionsversuches II mit *Gryllus bimaculatus* gemessenen Umgebungstemperaturen und Abbildung 6 zeigt deren Verlauf. Die Ergebnisse der verschiedenen angewandten Nachweismethoden des Infektionsversuches II mit *Gryllus bimaculatus* sind in Tabelle 23 dargestellt und deren Zusammenfassung in Tabelle 24.

Tabelle 22: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches II mit *Gryllus bimaculatus*

	Kontrollgruppe		Infizierte Gruppe	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Mittelwert	25,8 °C		25,3 °C	
Minimum	19,9 °C	23,9 °C	18,9 °C	23,1 °C
Maximum	26,7 °C	31,3 °C	25,8 °C	31,2 °C
Stabw.	2,1	2,2	2,0	2,4

Stabw. = Standardabweichung

Der ermittelte Mittelwert ergibt sich aus den gemessenen Minimum- und Maximumwerten. Daraus folgt, dass er ungleich der Tagesdurchschnittstemperatur ist. Die Maximaltemperatur von 31,3 °C und die Minimaltemperatur von 18,9 °C wurden an keinem Tag und in keiner Gruppe über- bzw. unterschritten.

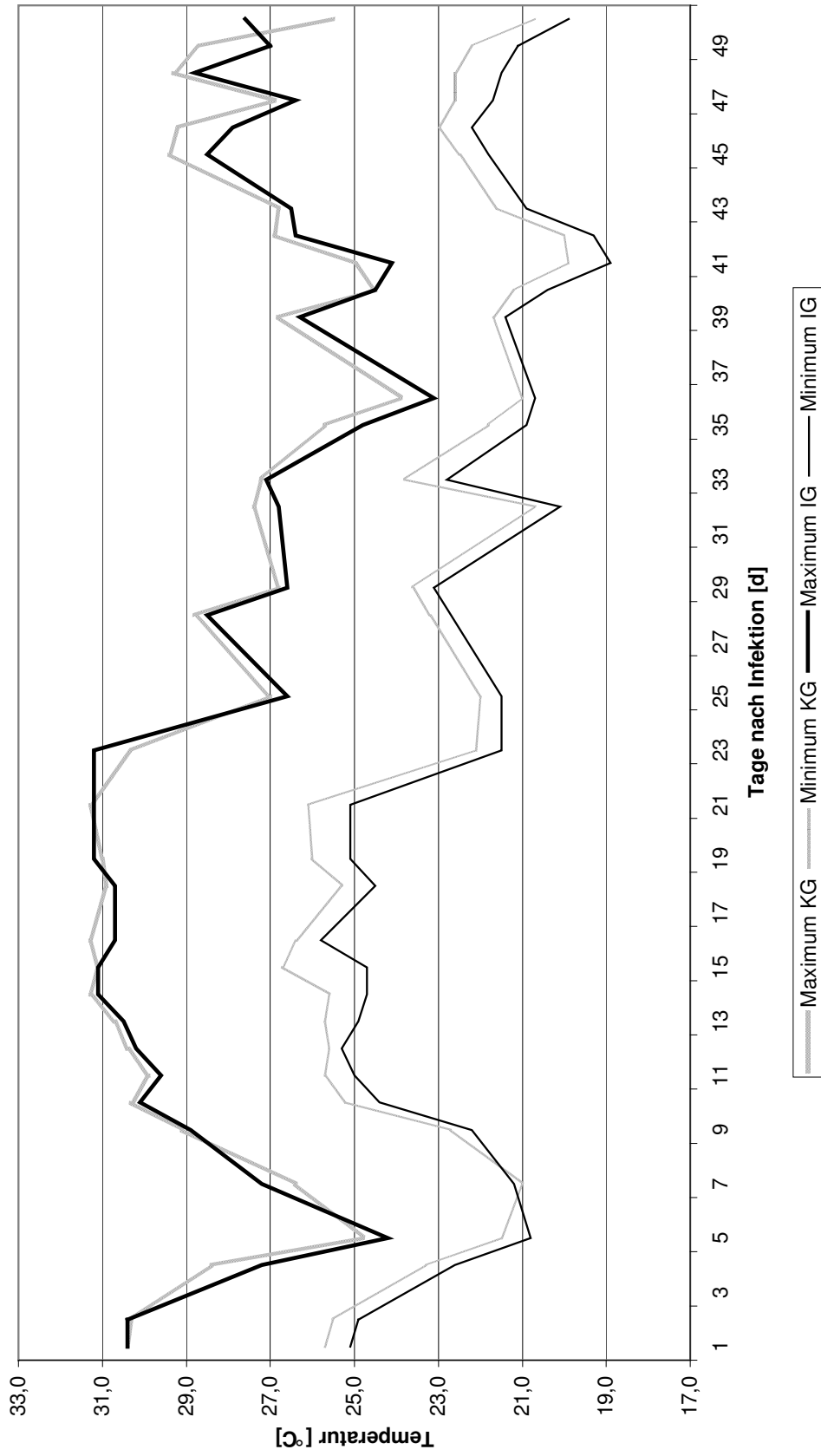


Abbildung 6: Temperaturverlauf des Infektionsversuches II mit *Gryllus bimaculatus*

Bis zum Ende des Versuches waren vier der infizierten Grillen (IT 06, IT 10, IT 13 und IT 15) und zwei Negativkontrollgrillen (KT 08 und KT 09) gestorben. Während des Versuches erschien die Grille IT 10 ab dem 35. Tag langsamer und starb am 46. Tag. Am 40. Tag fiel auf, dass das kaudale Abdomen von IT 13 mit Exkrementen verklebt war. Diese Grille starb sieben Tage später. Aus der Kontrollgruppe lag die Grille KT 08 am 12. Tag auf dem Rücken, konnte sich aus eigener Kraft kaum bewegen und starb am 14. Tag. Die Grille KT 09 starb plötzlich ohne vorherige Symptome 14 Tage nach der Infektion. Die Todesursachen beider Kontrollgrillen waren unbekannt. Ein Zusammenhang mit einer Virusinfektion konnte nicht nachgewiesen werden.

Bei der Sektion konnte bei einer Grille aus der infizierten Gruppe (IT 06), die im Laufe des Versuches ohne vorherigen Symptome verstorben war, eine bläulich irisierende Färbung festgestellt werden.

Auf Zellkultur konnte aus einer der infizierten Grillen (IT 06) sowohl auf TH-1 als auch auf VH2 Virus isoliert werden. Dabei handelte es sich um die irisierende Grille. Es konnte aus keiner Probe der Kontrollgrillen Virus isoliert werden.

Die infizierte Grille, aus der Virus isoliert wurde, war auch in der nested PCR positiv. Zusätzlich war das Ergebnis bei zwei Grillen (IT 08 und IT 15) fraglich, d.h. es waren sehr schwache Banden der gesuchten Größe bei diesen Grillen sichtbar. In der nested PCR waren alle nicht infizierten Kontrollgrillen negativ.

Bei den histologischen Untersuchungen erschien bei einer Grille (IT 06) eine große Zahl der Adipozyten vergrößert. In zahlreiche Adipozyten fiel im Zytoplasma eine homogene stark basophile grobschollige Masse auf. Zwei Proben (IT 10 und IT 15) konnten histologisch nicht ausgewertet werden. Bei den Proben vier weiterer infizierter Grillen (IT 02, IT 08, IT 12 und IT 18) und

denen der drei untersuchten Kontrollgrillen (KT 03, KT 06 und KT 10) konnten keine histopathologischen Veränderungen festgestellt werden.

Bei der In-situ-Hybridisierung konnten bei einer infizierten Grille (IT 06) deutliche Signale festgestellt werden. Diese Grille war auch in allen anderen Untersuchungsmethoden positiv. Keine Signale konnten bei den anderen drei untersuchten Infizierten (IT 08, IT 10 und IT 15) und den drei untersuchten Negativkontrollgrillen (KT 03, KT 06 und KT 10) festgestellt werden.

Von den drei im Elektronenmikroskop untersuchten Grillen (IT 06, IT 08 und IT 10) war nur die Grille IT 06 positiv, von der auch Virus isoliert werden konnte.

Tabelle 23: Übersicht der Ergebnisse des Infektionsversuches II mit *Gryllus bimaculatus*

Tier	Symptome	G/E	Irideszenz	TH-1	VH2	PCR	Histo	EM	ISH
KT 01	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 02	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 03	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	-
KT 04	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 05	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 06	+	E-	-	-	-	-	-	n.u.	-
KT 07	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 08	-	G	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 09	-	G	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
KT 10	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	-
IT 01	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 02	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
IT 03	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 04	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 05	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 06	-	G	+	+	+	+	+	+	+
IT 07	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 08	-	E	-	-	-	(+)	-	-	-
IT 09	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 10	+	G	-	-	-	-	n.a.	-	-
IT 11	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 12	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
IT 13	+	G	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 14	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 15	-	G	-	-	-	(+)	n.a.	k.P.	-
IT 16	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 17	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 18	-	E	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.
IT 19	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 20	-	E	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.

G = gestorben; E = euthanasiert; + = positives Ergebnis der jeweiligen Nachweismethode; - = negatives Ergebnis der jeweiligen Nachweismethode; (+) =schwache Bande in der nested PCR; n.u. = nicht untersucht; n.a. = nicht auswertbar; k.P. = keine Probe vorhanden

In diesem Versuch konnte die nested PCR zu 15 % positive (3 Grillen) unter den infizierten Grillen detektieren. In der Zellkultur waren 5 % (1 Grille) positiv. In den histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen und der ISH konnten diese 5 % (1 Grille) bestätigt werden. Allerdings konnte die Grille IT 15 weder histologisch noch elektronenmikroskopisch untersucht werden.

Tabelle 24: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden des Infektionsversuches II mit *Gryllus bimaculatus*

Nachweismethode	Prozentsatz an positiven infizierten Grillen	Anzahl positiver infizierter Grillen
Irideszenz	5	1
TH-1- und VH2-Zellkulturen	5	1
PCR	15	3
Histo	5	1
EM	5	1
ISH	5	1

4.3.3 Infektionsversuch III mit *Gryllus bimaculatus*

Die nachfolgende Tabelle 25 zeigt die Auswertung der während des Infektionsversuches III mit *Gryllus bimaculatus* gemessenen Umgebungstemperaturen und Abbildung 7 zeigt deren Verlauf. Die Ergebnisse der verschiedenen angewandten Nachweismethoden des Infektionsversuches III mit *Gryllus bimaculatus* sind in Tabelle 26 dargestellt und deren Zusammenfassung in Tabelle 27.

Tabelle 25: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches III mit *Gryllus bimaculatus*

	Kontrollgruppe		Infizierte Gruppe	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Mittelwert	23,5 °C		22,7 °C	
Minimum	21,3 °C	22,1 °C	20,1 °C	21,1 °C
Maximum	24,3 °C	29,7 °C	23,3 °C	29 °C
Stabw.	0,7	1,7	0,8	1,7

Stabw. = Standardabweichung

Der ermittelte Mittelwert ergibt sich aus den gemessenen Minimum- und Maximumwerten. Daraus folgt, dass er ungleich der Tagesdurchschnittstemperatur ist. Die Maximaltemperatur von 29,7 °C und die Minimaltemperatur von 20,1 °C wurden an keinem Tag und in keiner Gruppe über- bzw. unterschritten.

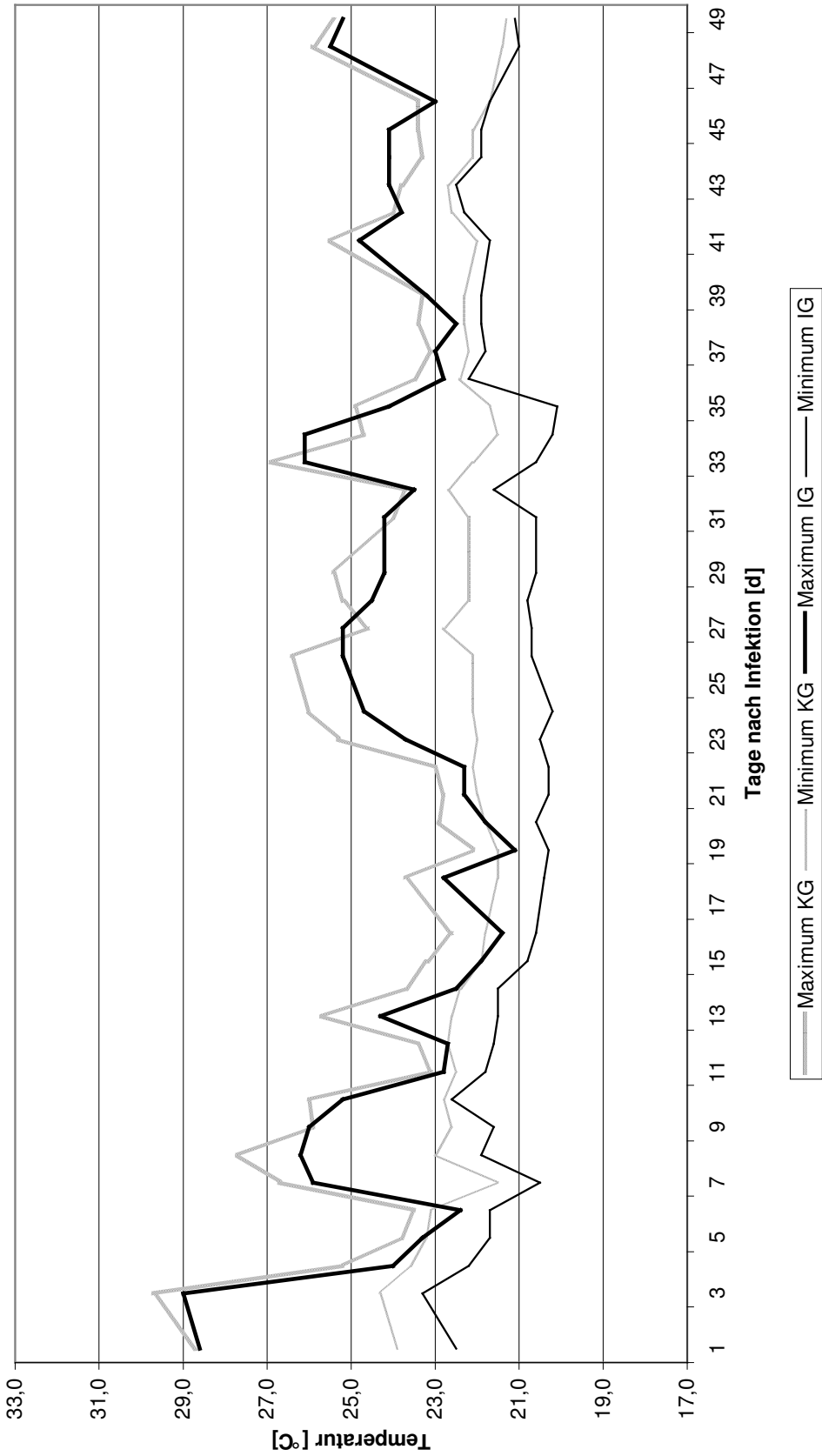


Abbildung 7: Temperaturverlauf des Infektionsversuches III mit Gryllus bimaculatus

Bis zum Ende des Versuches waren drei der infizierten Grillen (IT 08, IT 11 und IT 20) gestorben und eine infizierte Grille (IT 15) wurde vorzeitig euthanasiert. Die Grille IT 15 begann sich am 35. Tag zu häuten, hatte dabei aber massive Probleme und steckte am nächsten Tag in ihrer alten Haut fest. Sie wurde daher vorzeitig euthanasiert. Am 18. Tag des Versuches erschien Grille IT 11 langsamer in ihren Bewegungen und starb am 31. Tag. Die Grillen IT 08 und IT 20 starben plötzlich ohne vorherige Symptome 31 bzw. 33 Tage nach der Infektion. Von den Negativkontrollgrillen starb kein Tier.

Bei der Sektion konnte bei zwei Grillen aus der infizierten Gruppe (IT 08 und IT 16) eine geringgradige bläulich irisierende Färbung festgestellt werden. Eine der beiden Grillen (IT 08) war im Verlauf des Versuches verstorben.

Aus fünf der infizierten Grillen (IT 08, IT 11, IT 14, IT 16 und IT 20) konnte sowohl auf TH-1- als auch auf VH2- Zellen Virus isoliert werden. Darunter waren auch die beiden irisierenden Grillen. Es konnte aus keiner Probe der Kontrollgrillen Virus isoliert werden.

In der nested PCR konnte bei sechs der 20 infizierten Grillen (IT 08, IT 11, IT 14, IT 16, IT 17 und IT 20) Virus-DNA amplifiziert werden. Die zehn Kontrollgrillen waren negativ. Die sequenzierten Amplikons von zwei Proben (IT 08 und IT 17) zeigten eine 100 %ige Übereinstimmung mit der entsprechenden Nukleotidsequenz des MCP-Gens des eingesetzten Isolates 100/01.

Bei den histopathologischen Untersuchungen fielen bei fünf infizierten Grillen (IT 08, IT 11, IT 14, IT 16 und IT 20) zahlreiche Adipozyten von unterschiedlicher Größe auf, deren Zytoplasma eine homogene stark basophile grobschollige Masse aufwies. Eine der Proben (IT 17) war nicht auswertbar. Bei den Proben der neun weiteren untersuchten infizierten Grillen und denen der sechs untersuchten Kontrollgrillen konnten keine histopathologischen Veränderungen festgestellt werden.

Bei der In-situ-Hybridisierung konnten bei fünf infizierten Grillen (IT 08, IT 11, IT14, IT 16 und IT 20) deutliche positive Signale festgestellt werden. Alle fünf dieser Proben waren auch in allen anderen Untersuchungsmethoden positiv. Keine Signale konnten bei den anderen beiden untersuchten Infizierten (IT 15 und IT 17) und der untersuchten Negativkontrollgrille (KT 07) festgestellt werden.

Bei fünf (IT 08, IT 11, IT 14, IT 16 und IT 20) der sechs untersuchten infizierten Grillen konnten Viren im Fettkörper elektronenmikroskopisch dargestellt werden (Abbildung 17). Bei IT 15 konnten keine Viruspartikel gefunden werden.

Tabelle 26: Übersicht der Ergebnisse des Infektionsversuches III mit *Gryllus bimaculatus*

Tier	Symptome	G/E	Irideszenz	F	TH-1	VH2	PCR	Histo	EM	Sequ.	ISH
KT	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	-
KT	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
KT	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
IT 01	-	E	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 02	-	E	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 03	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
IT 04	-	E	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 05	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.	n.u.
IT 06	-	E	-	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.
IT 07	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
IT 08	-	G	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IT 09	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
IT 10	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
IT 11	+	G	-	+	+	+	+	+	+	n.u.	+
IT 12	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
IT 13	-	E	-	-	-	-	-	k.P.	k.P.	n.u.	n.u.
IT 14	-	E	-	-	+	+	+	+	+	n.u.	+
IT 15	+	VE	-	+	-	-	-	-	-	n.u.	-
IT 16	-	E	+	+	+	+	+	+	+	n.u.	+
IT 17	-	E	-	-	-	-	+	n.a.	k.P.	+	-
IT 18	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
IT 19	-	E	-	-	-	-	-	-	k.P.	n.u.	n.u.
IT 20	-	G	-	-	+	+	+	+	+	n.u.	+

G = gestorben; E = euthanasiert; VE = vorzeitig euthanasiert; + = positives Ergebnis der jeweiligen Nachweismethode; - = negatives Ergebnis der jeweiligen Nachweismethode; F = mit 0,45 µm Filter filtriert; Sequ. = PCR-Produkt sequenziert und die erhaltene Sequenz war zu 100 % mit der entsprechenden Sequenz des Isolates 100/01 identisch; n.u. = nicht untersucht; n.a. = nicht auswertbar; k.P. = keine Probe vorhanden

Die nested PCR war die sensitivste Methode und ergab in 30 % der untersuchten Proben von infizierten Grillen (6 Grillen) ein positives Ergebnis. In der Zellkultur konnte aus 25 % der Proben (5 Grillen) Virus isoliert werden, wobei diese auch in der PCR positiv waren. Auch histologisch, elektronenmikroskopisch und mit der ISH konnten die gleichen 25 % an Positiven (5 Grillen) ermittelt werden. Allerdings konnte die Grille IT 17 weder histologisch noch elektronenmikroskopisch untersucht werden, da bei der Sektion keine Proben gewonnen werden konnten. Die 10 % der Grillen (2 Grillen), die eine irisierende Färbung aufwiesen, waren auch in den anderen Untersuchungsmethoden positiv.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Ergebnisse der verschiedenen Nachweismethoden des Infektionsversuches III mit *Gryllus bimaculatus*

Nachweismethode	Prozentsatz an positiven infizierten Grillen	Anzahl positiver infizierter Grillen
Irideszenz	10	2
TH-1- und VH2-Zellkulturen	25	5
PCR	30	6
Histo	25	5
EM	25	5
ISH	25	5

4.3.4 Gesamtauswertung der Infektionsversuche I bis III mit *Gryllus bimaculatus*

Insgesamt wurden in den Infektionsversuchen I bis III 60 Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* infiziert und 30 Grillen dienten als Negativkontrolltiere. Mit Hilfe des χ^2 -Tests wurde anhand aller Ergebnisse der nested PCR statistisch nachgewiesen, dass durch das Dippen in IIV-haltigen (Isolat 100/01) Zellkulturüberstand eine Infektion der Tiere erfolgreich war. Die Irrtumswahrscheinlichkeit liegt bei 0,1 % (Tabelle 41 im Anhang). Bei einem statistischen Vergleich der Ergebnisse der nested PCR über alle drei Versuche zeigt der χ^2 -Test, dass ein hoch signifikanter Unterschied vorhanden ist (Tabelle 42 im Anhang). Zusätzlich hat die statistische Auswertung nach dem χ^2 -Test ergeben, dass die nested PCR, die Zellkultur (TH-1 und VH2) und die Histologie mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % die gleichen Ergebnisse liefern (Tabelle 43 im Anhang).

Bei einem Vergleich der beiden Methoden In-situ-Hybridisierung und Elektronenmikroskopie mit der nested PCR hat die statistische Auswertung nach dem χ^2 -Test ergeben, dass sie mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 2,5 % die gleichen Ergebnisse liefern (Tabelle 43 im Anhang). Wobei hier zu bemerken ist, dass die untersuchte Probenanzahl bei der In-situ-Hybridisierung und der Elektronenmikroskopie zu gering ist, um eine sichere statistische Aussage treffen zu können.

Der Vergleich der nested PCR mit der Zellkultur nach dem McNemar-Test zeigt ebenfalls, dass die nested PCR die sensitivere Methode ist (Tabelle 44 im Anhang). Die Untersuchungsmethoden Histologie, In-situ-Hybridisierung und Elektronenmikroskopie konnten aufgrund der geringen Stichprobenzahl hierbei nicht berücksichtigt werden.

Irideszenz in der Sektion

Insgesamt konnte bei acht der 60 infizierten Grillen in der Sektion eine bläulich irisierende Färbung beobachtet werden. Bei diesen acht Grillen konnte nach der Eröffnung des Abdomens ein bläuliches Schimmern vor allem des Fettkörpergewebes beobachtet werden (Abbildung 8). Aufgrund der schnell eintretenden Autolyse bei Grillen war bei den meisten Tieren eine genaue Zuordnung der Irideszenz zu anderen Organen nicht möglich.

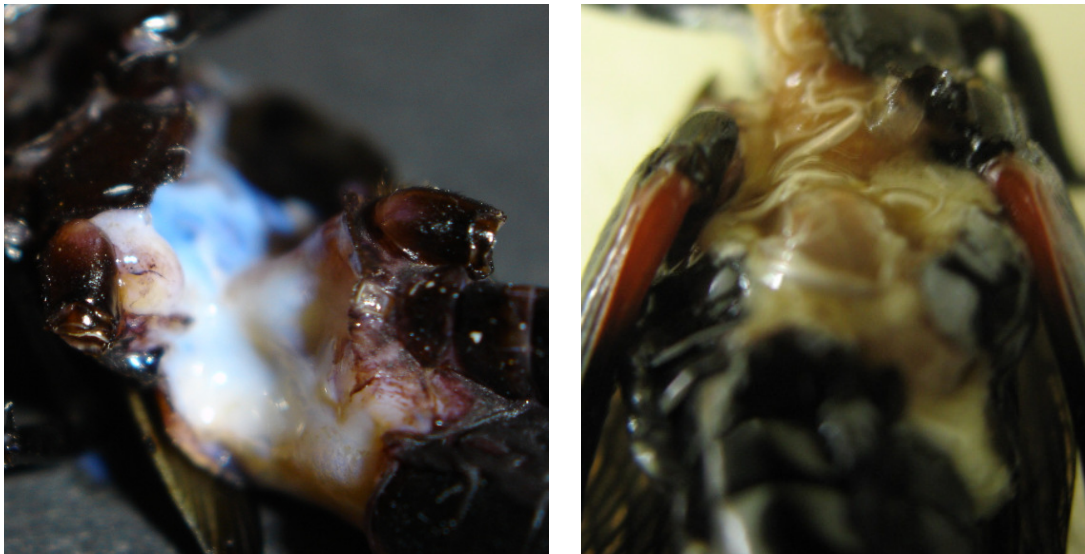


Abbildung 8: Bläuliche Irideszenz einer infizierten Grille (IV GB 22 IT) links; rechts Negativkontrolle

Virusisolierung auf Zellkultur

Alle 90 gesammelten Fettkörperproben wurden auf TH-1 und VH2-Zellkulturen inokuliert. Insgesamt konnten auf TH-1- und VH2-Zellkulturen in je 15 Fällen ein CPE beobachtet und Virus isoliert werden. Der durch Iridoviren verursachte CPE ist durch große, abgerundete Zellen und Zelllyse charakterisiert (Abbildung 9 bis 12). Die Virusisolierung mit der SF-21-Zellkultur war nicht durchführbar. Bei sehr hohen Titern von Iridoviren konnte man zwar nach ein bis drei Tagen ein positives Ergebnis ablesen, aber die Beurteilung fraglicher oder negativer Proben wurde durch die Tatsache erschwert, dass nach ca. fünf Tagen sowohl die infizierten Zellen als auch die Zellkontrollen abstarben.

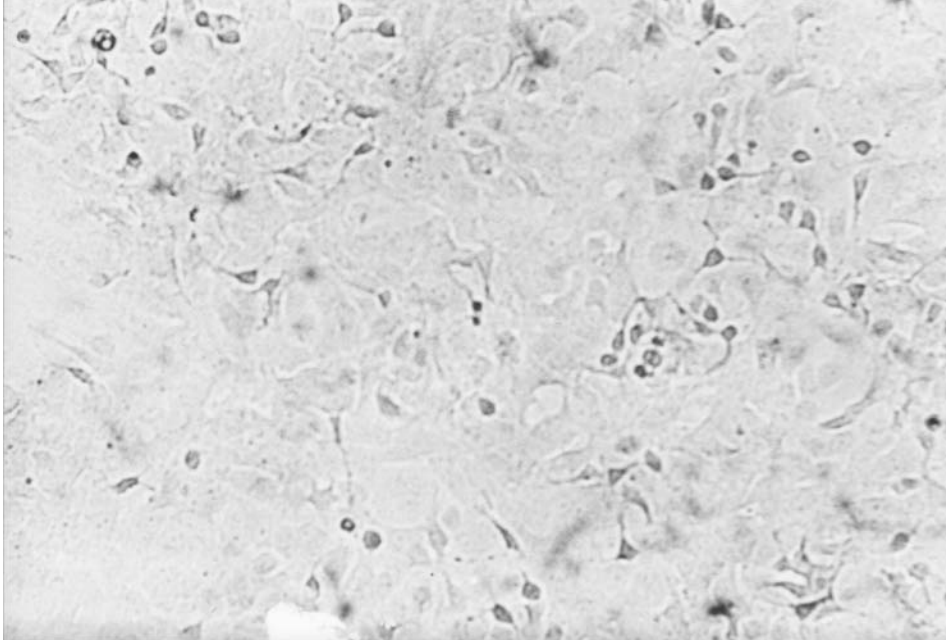


Abbildung 9: Unveränderte konfluente TH-1-Zellkultur. Nativpräparat. 100x

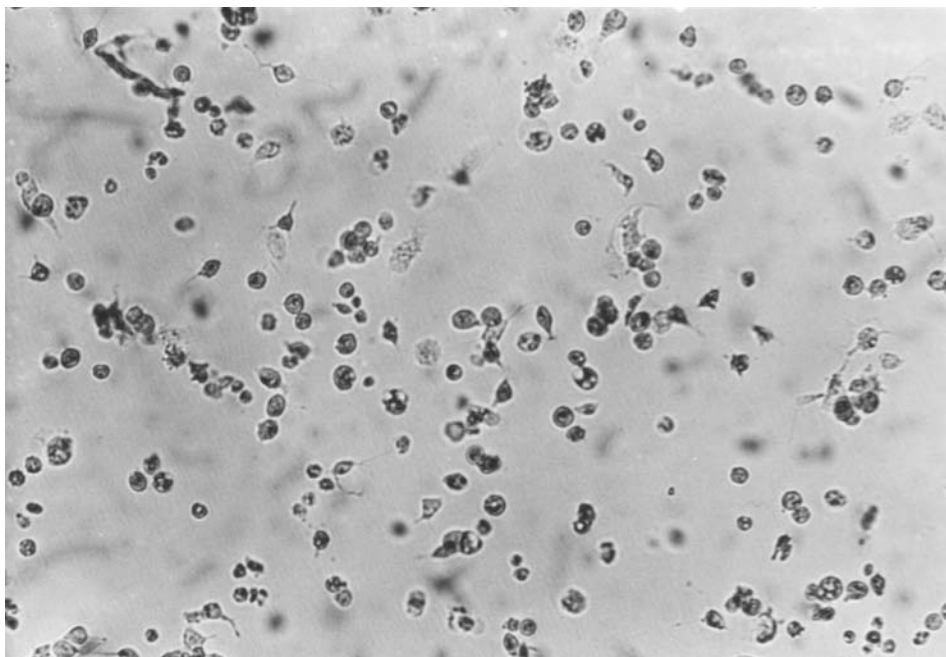


Abbildung 10: Iridovirus-Isolat IV GB 20 IT CPE in TH-1-Zellkultur 1 Tag p.i.. Nativpräparat. 100x

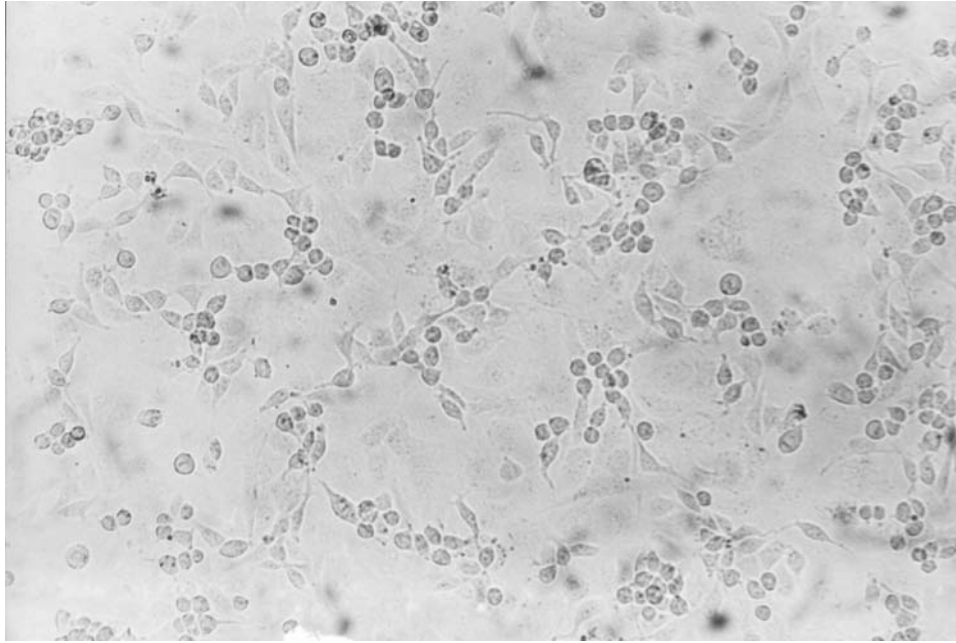


Abbildung 11: Unveränderte konfluente VH2-Zellkultur. Nativpräparat. 100x

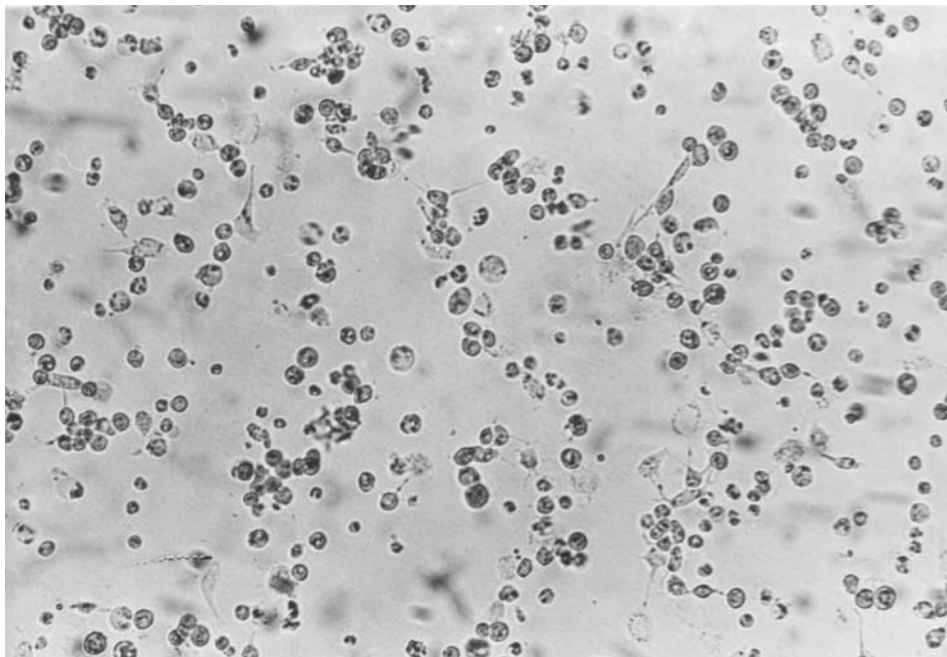
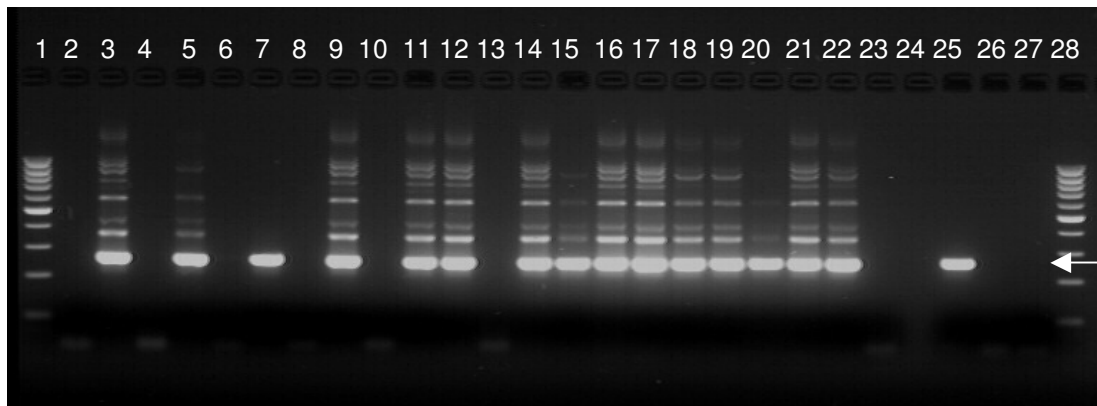


Abbildung 12: Iridovirus-Isolat IV GB 20 IT CPE in VH2-Zellkultur 1 Tag p.i.. Nativpräparat. 100x

Nested PCR

In allen drei Infektionsversuchen konnten insgesamt von 24 Tieren der 60 infizierten Grillen in der nested PCR Amplikons des gesuchten 270 bp langen Teilabschnittes des MCP-Gens gewonnen werden. Zwei der Amplikons aus Infektionsversuch III wurden zur Verifizierung der Ergebnisse sequenziert. Die erhaltene Sequenz war zu 100 % identisch mit der entsprechenden Sequenz des Isolates 100/01.



Legende

1 und 28:	100 bp DNA-Ladder	25:	PK
2:	NK 1 DNA-Präparation	26:	NK PCR 1
3 bis 22:	DNA von I GB 01 IT bis I GB 20 IT	27:	NK PCR 2
23:	NK 2 DNA-Präparation		
24:	leer		

Abbildung 13: Nested PCR der infizierten Gruppe *Gryllus bimaculatus* Infektionsversuch I

Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (←).

Histologisch-pathologische Untersuchungen

Bei den histologisch-pathologischen Untersuchungen konnte bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der HE-gefärbten Schnitte bei 14 der 38 untersuchten infizierten Fettkörperproben Hinweise auf eine Virusinfektion festgestellt werden. Diese wurden später mit Hilfe der elektronenmikroskopischen Untersuchungen abgeklärt. Wie bei KLEESPIES et al. (1999) erschien eine große Zahl der Adipozyten vergrößert. Zahlreiche der Adipozyten unterschiedlicher Größe wiesen in ihrem Zytoplasma eine homogene stark basophile grobschollige Masse auf (Abbildung 15). Die 12 untersuchten Proben von Kontrolltieren waren histopathologisch unauffällig (Abbildung 14).

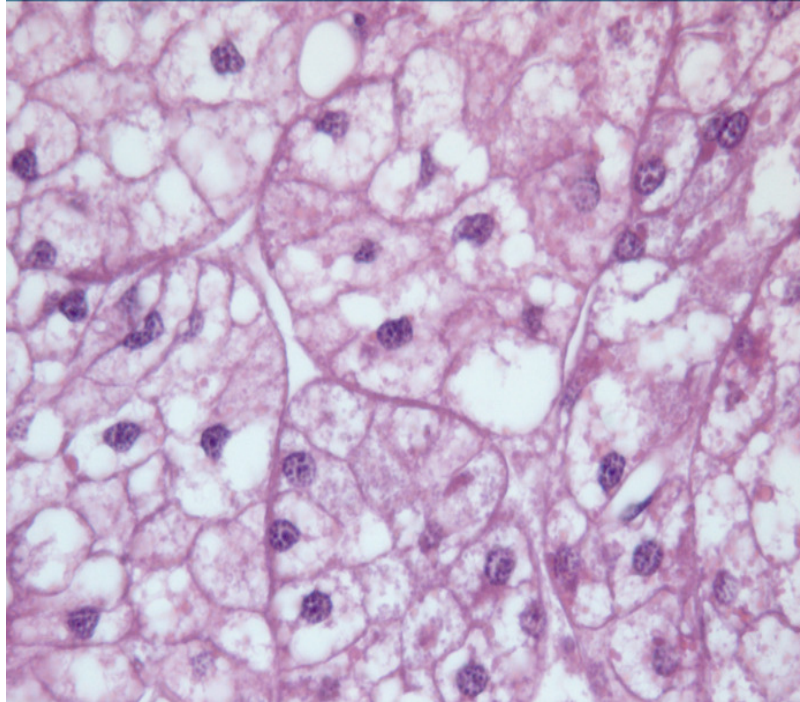


Abbildung 14: Histologischer Schnitt Fettkörper *Gryllus bimaculatus* II GB 02 KT. HE. Originalvergrößerung x 40x

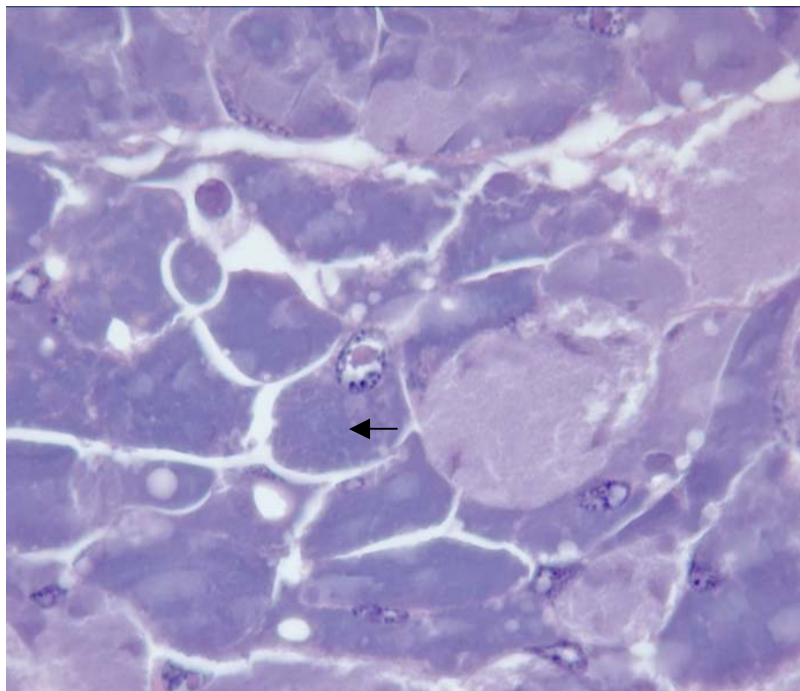


Abbildung 15: Histologischer Schnitt Fettkörper *Gryllus bimaculatus* II GB 10 IT. HE. Originalvergrößerung x 40x

Homogene stark basophile grobschollige Masse im Zytoplasma eines Adipozyten (←).

In-situ-Hybridisierung

Bei der In-situ-Hybridisierung mit der 243 bp langen IIV-MCP-spezifischen DIG-markierten Sonde zeigten sich bei insgesamt 9 von 30 untersuchten infizierten *Gryllus bimaculatus* im Fettkörper deutliche Signale (Abbildung 16). Die sieben untersuchten Kontrollgrillen waren negativ.

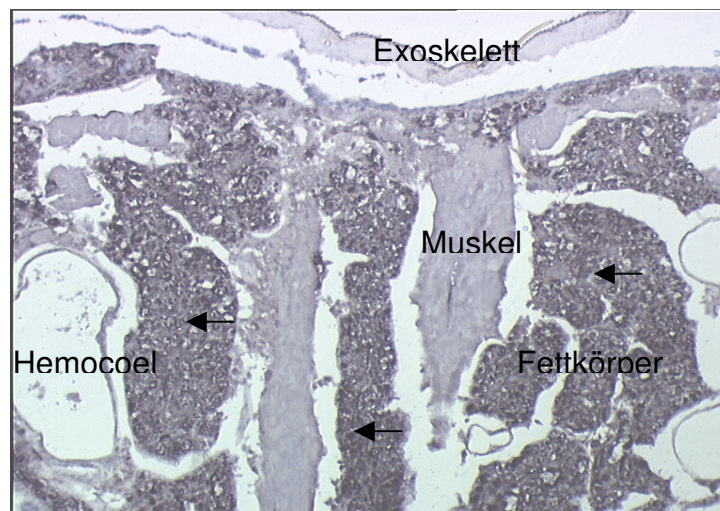


Abbildung 16: Deutliche Signale (←) bei der In-situ-Hybridisierung im Fettkörper einer infizierten *Gryllus bimaculatus*.

Elektronenmikroskopie

Insgesamt konnten bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen bei 14 von 28 untersuchten infizierten Tieren in den Fettkörperzellen Ansammlungen von Iridoviren detektiert werden. Im Zytoplasma der Adipozyten fanden sich massive Ansammlungen von hexagonalen Viruspartikeln. Diese waren entweder parakristallin angeordnet, oder lagen ungeordnet dicht beieinander (Abbildung 17). In Einzelfällen fanden sich nur wenige Viruspartikel in den Adipozyten.

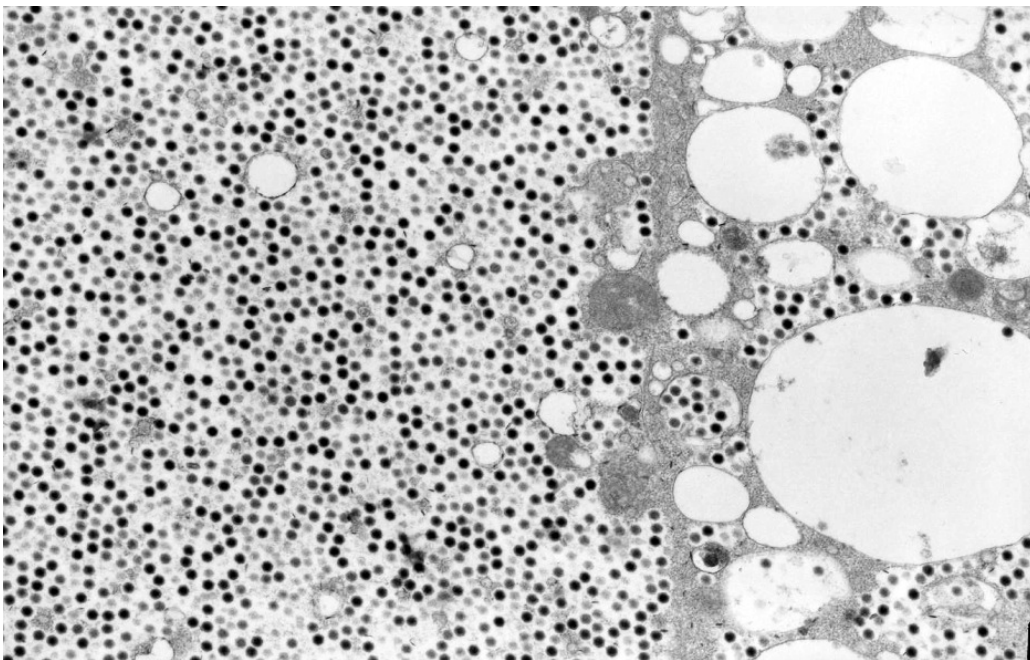


Abbildung 17: Elektronenmikroskopisches Bild des Fettkörpers von Grille III GB 20 IT: Assembly site. 8000x

4.3.5 Infektionsversuch IV mit *Gryllus bimaculatus* für den Übertragungsversuch mit *Pogona vitticeps*

Die nachfolgende Tabelle 28 zeigt die Auswertung der während des Infektionsversuches IV mit *Gryllus bimaculatus* gemessenen Umgebungstemperaturen.

Tabelle 28: Temperatúrauswertung *Gryllus bimaculatus* Infektionsversuch IV

	Kontrollgruppe		Infizierte Gruppe	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Mittelwert	23,3 °C		22,2 °C	
Minimum	20,3 °C	28,3 °C	17,8 °C	20,4 °C
Maximum	24,1 °C	22,2 °C	22,8 °C	29,3 °C
Stabw.	0,8	1,4	1,2	2,1

Stabw. = Standardabweichung

Der ermittelte Mittelwert ergibt sich aus den gemessenen Minimum- und Maximumwerten. Daraus folgt, dass er ungleich der Tagesdurchschnittstemperatur ist. Die Maximaltemperatur von 29,3 °C und die Minimaltemperatur von 17,8 °C wurden an keinem Tag und in keiner Gruppe über- bzw. unterschritten.

Durch die Gruppenhaltung der Grillen war eine Beobachtung von Symptomen bei einzelnen Grillen nicht möglich. Bis zum Ende des Versuches konnten von 75 infizierten Grillen und neun Negativkontrollgrillen Proben gewonnen werden. Im Verlauf des Versuches waren 59 der infizierten Grillen und zwei Negativkontrollgrillen gestorben und sieben infizierte Grillen und sieben Kontrollgrillen wurden am Ende des Versuches euthanasiert. Bei 62 Grillen aus der infizierten Gruppe konnte eine bläulich irisierende Färbung festgestellt werden, bei einer weiteren Grille war diese sehr geringgradig ausgeprägt und bei drei weiteren Grillen fraglich. Bis auf IT 02 waren alle 75 infizierten Grillen in der TH-1-Zellkultur positiv. Die Titer der 11 titrierten Grillenproben lagen zwischen $10^{6,5}$ und $10^{7,75}$ KID₅₀/ml.

4.4 *Pogona vitticeps*

Im folgenden Text wird zwischen einzelnen Tieren und Gruppen von Bartagamen der Spezies *Pogona vitticeps* unterschieden. Die Begriffe KT und IT bezeichnen einzelne Tiere, wobei KT Negativkontrolltiere und IT mit Virus infizierte Tiere beschreibt. Die Begriffe KG und IG bezeichnen Gruppen von Bartagamen, wobei KG die Kontrolltiere und IG die mit Virus infizierten Tiere bezeichnet.

4.4.1 Untersuchungen der Elterntiere der *Pogona vitticeps* bei Bezug der Eier

Bei den Rachen- und Kloakentupferproben beider Elternpaare der Bartagamen, die bei der Abholung der Eier 2004 gewonnen wurden, konnte keine IIV-DNA in der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) nachgewiesen und keine zytopathogenen Agenzien in der Zellkultur isoliert werden.

4.4.2 Untersuchungen der *Pogona vitticeps* vor Versuchsbeginn

Die Tupfer, die zu Beginn der Aufzucht am 31.08.2004 von allen geschlüpften Tieren entnommen wurden, waren in der Zellkultur und mit der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) negativ. Die Tupfer I, die zwei Wochen vor Versuchsbeginn von allen zehn Bartagamen (Gelege II) entnommen wurden, waren in der PCR nach JUST und ESSBAUER (2001) und auf Zellkultur negativ. Es konnten keine IIV nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung mit der nested PCR waren nach einer DNA-Präparation der Rachen- und Kloakentupfer I von PV 10 KT, der vierten Negativkontrolle, positiv. Bei dem Kloakentupfer I von PV 03 IT und den Rachentupfern I von PV 05 IT und PV 08 IT waren sehr schwache Banden erkennbar. Alle anderen Proben waren negativ (Tabellen 34 und 35 im Anhang). Die zwei in der nested PCR erhaltenen Amplikons von PV 10 KT wurden sequenziert; die erhaltene Sequenz stimmte zu 100 % mit der entsprechenden Sequenz

von 100/01 überein. Die parasitologischen Untersuchungen waren alle negativ.

Bei Bartagame PV 01 KT waren die auf Zellkultur und ohne vorherige DNA-Präparation in der nested PCR untersuchten Organproben negativ. Es konnte kein Virus isoliert werden und keine DNA amplifiziert werden. Bei der, nach dem Auftreten der positiven Ergebnisse bei den Negativkontrolltieren, mit der nested PCR untersuchten DNA (des Überstandes der Organproben) von PV 01 KT war bei der Probe vom Gehirn eine sehr schwache Bande der gesuchten Größe sichtbar. Allerdings war die Bande zu schwach, um das Ergebnis durch Sequenzierung zu verifizieren. Die anderen DNA-präparierten Überstände der Organproben waren negativ (Tabelle 32 im Anhang).

4.4.3 Infektionsversuch mit *Pogona vitticeps*

Die nachfolgende Tabelle 29 zeigt die Auswertung der während des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps* gemessenen Umgebungstemperaturen und Abbildung 23 im Anhang zeigt deren Verlauf.

Tabelle 29: Temperatúrauswertung des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*

	Kontrollgruppe		Infizierte Gruppe	
	Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
Mittelwert	29 °C		28,6 °C	
Minimum	18,3 °C	26,4 °C	18,2 °C	27,9 °C
Maximum	23,3 °C	41,3 °C	24,7 °C	40,5 °C
Stabw.	1,3	2,0	1,8	2,2

Stabw. = Standardabweichung

Der ermittelte Mittelwert ergibt sich aus den gemessenen Minimum- und Maximumwerten. Daraus folgt, dass er ungleich der Tagesdurchschnittstemperatur ist. Die Maximaltemperatur von 41,3 °C und die

Minimaltemperatur von 18,2 °C wurden an keinem Tag und in keiner Gruppe über- bzw. unterschritten.

Bei den täglichen Beobachtungen fiel in der Gruppe der infizierten Bartagamen Tier PV 02 IT auf, da es am siebten Tag nach Versuchsbeginn einen Kloakenvorfall hatte. Die Ursache dafür war ein großes Stück Küchenrolle, das als Bodengrund benutzt wurde und irrtümlich von der Bartagame gefressen wurde. Der Fremdkörper wurde aus der Kloake entfernt, der Kloakenvorfall wurde reponiert und die Bartagame erholte sich. Die Bartagame PV 03 IT war am neunten Tag nach Versuchsbeginn auffällig ruhig. Dieser Zustand normalisierte sich nach fünf Tagen wieder. Bartagame PV 05 IT war ab dem siebten Tag des Versuches sehr ruhig und bewegte sich wenig und langsam. Nach 11 Tagen erschien sie wieder unauffällig. Nach 38 Tagen erschien die Bartagame drei Tage lang erneut inaktiv und zeigte verminderten Appetit. Die Bartagame PV 08 IT war die körperlich kleinste der infizierten Bartagamen und erschien, vor allem nach den Tagen, an denen Lebendfutter verabreicht wurde, zeitweise ruhiger als die anderen Bartagamen. Die Kontrollbartagamen zeigten keine Auffälligkeiten. Bis zum Ende des Versuches am 25.05.2005 war keine der infizierten Bartagamen und keine Negativkontrollbartagame verstorben.

Bei den Sektionen fanden sich kaum pathologisch-anatomische Veränderungen. Die bei nahezu allen Tieren beobachtete in unterschiedlichem Ausmaß ausgeprägte netzartige gelbliche Zeichnung der geringgradig brüchigen Leber erwies sich bei histologisch-pathologischen Untersuchungen als gering- bis mittelgradige Glykogenspeicherung. Bartagame PV 08 IT war stark zurückgeblieben (33 g Körpergewicht). Es konnte kein Fettkörper gefunden werden. Das muskelstarke Herz fiel auf, kann aber in Ermangelung von Normalbefunden nicht ausgewertet werden. In der kranialen Leibeshöhle befanden sich unter der Lunge geringe Mengen einer rötlichen Flüssigkeit (Hämohydrothorax).

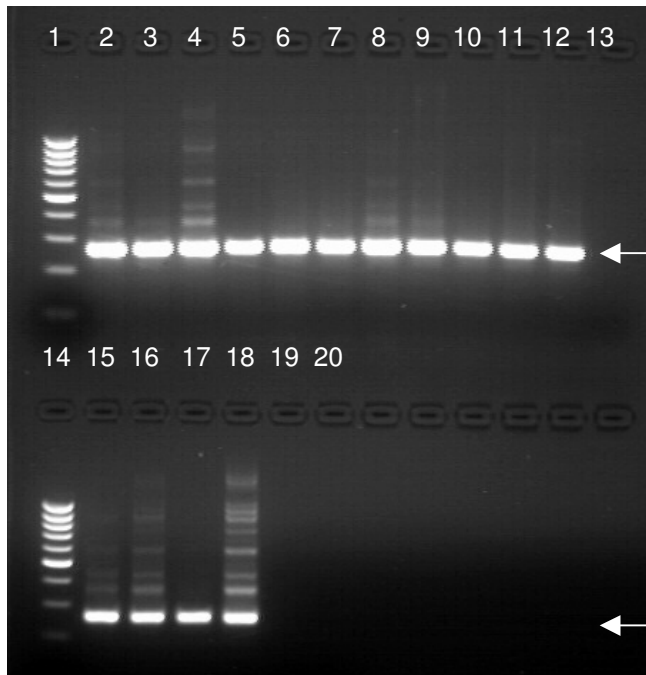
4.4.3.1 Organproben

Auf TH-1 und VH2 konnte aus keiner Organprobe der Bartagamen Virus isoliert werden. Die Ergebnisse der nested PCR werden in Tabelle 32 im Anhang dargestellt. Unerwarteter Weise waren in der nested PCR nicht alle Negativkontrollbartagamen, sondern nur zwei der insgesamt zehn Bartagamen in allen Organen negativ, darunter die vierte Negativkontrolle PV 10 KT und die vierte infizierte Bartagame PV 06 IT. Bei PV 02 IT waren alle Organe außer dem Fettkörper positiv (Abbildung 18). Bei den restlichen infizierten Bartagamen und Kontrollbartagamen waren verschiedene Organe positiv (Tabelle 30). Bei PV 03 IT waren Zunge, Trachea, Herz, Dickdarm und Haut positiv. Bei PV 04 KT waren bei den Organen Trachea, Dünndarm und Fettkörper Banden der gesuchten Größe sichtbar und bei PV 05 IT konnte man diese bei den Organen Zunge, Dickdarm, Niere und Haut erkennen. Bei Bartagame PV 07 KT waren Trachea und Fettkörper, bei PV 08 IT Magen, Dickdarm und Haut (Abbildung 19) und bei PV 09 IT Gonaden, Fettkörper und Haut positiv. Um sicher zu gehen, dass es sich bei dem PCR-Produkt auch um die gesuchte DNA handelt, wurden die Proben PV 05 IT Zunge und Niere, PV 08 IT Haut und PV 09 IT Fettkörper sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen stimmten zu 100 % mit der entsprechenden Region des Isolates 100/01 überein.

Tabelle 30: Anzahl der positiven Tiere für die verschiedenen Organe der 10 *Pogona vitticeps* des Infektionsversuches

Organ	Ge	Zu	Tr	Lu	He	Ma	Düda	Dida	Le	Ni	Go	Fk	Ha
Positive	1	3	4	1	2	2	2	4	1	2	2	3	5

Ge = Gehirn; Zu = Zunge; Tr = Trachea; Lu = Lunge; He = Herz; Ma = Magen; Düda = Dünndarm; Dida = Dickdarm; Le = Leber; Ni = Niere; Go = Gonaden; Fk = Fettkörper; Ha = Haut

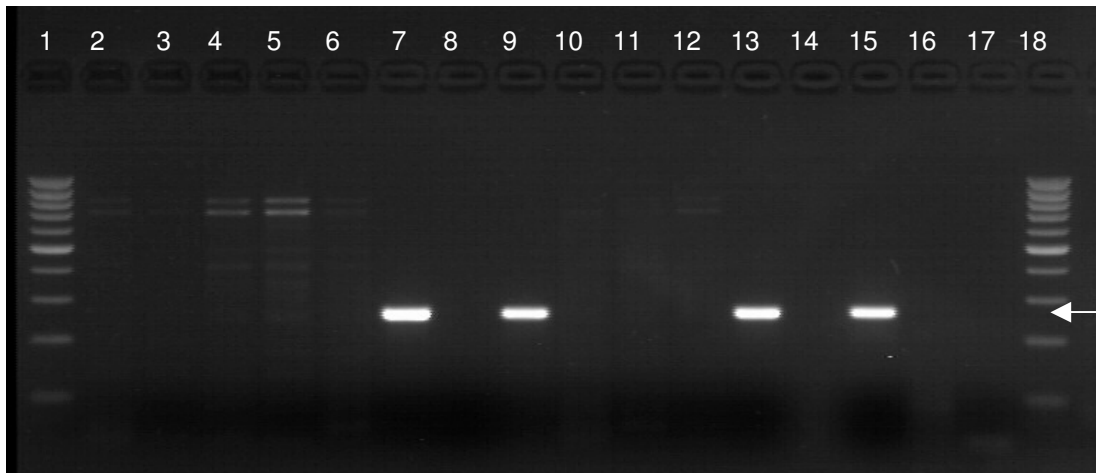


Legende

1:	100 bp DNA-Ladder	11:	DNA PV 02 IT Niere
2:	DNA PV 02 IT Gehirn	12:	DNA PV 02 IT Gonaden
3:	DNA PV 02 IT Zunge	13:	DNA PV 02 IT Fettkörper
4:	DNA PV 02 IT Trachea	14:	100 bp DNA-Ladder
5:	DNA PV 02 IT Lunge	15:	DNA PV 02 IT Haut
6:	DNA PV 02 IT Herz	16:	PK 1125/00
7:	DNA PV 02 IT Magen	17:	PK 626/00
8:	DNA PV 02 IT Dünndarm	18:	PK 100/01
9:	DNA PV 02 IT Dickdarm	19:	NK 1 PCR
10:	DNA PV 02 IT Leber	20:	NK 2 PCR

Abbildung 18: Nested PCR von *Pogona vitticeps* PV 02 IT = erstes infiziertes Tier

Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (←). Amplikons der gesuchten Größe von 270 bp konnten aus den Proben der Organe Gehirn, Zunge, Trachea, Lunge, Herz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere und Gonaden gewonnen werden.



Legende

1:	100 bp DNA-Ladder	10:	DNA PV 08 IT Leber
2:	DNA PV 08 IT Gehirn	11:	DNA PV 08 IT Niere
3:	DNA PV 08 IT Zunge	12:	DNA PV 08 IT Gonaden
4:	DNA PV 08 IT Trachea	13:	DNA PV 08 IT Fettkörper
5:	DNA PV 08 IT Lunge	14:	DNA PV 08 IT Haut
6:	DNA PV 08 IT Herz	15:	PK 100/01
7:	DNA PV 08 IT Magen	16:	NK 1 PCR
8:	DNA PV 08 IT Dünndarm	17:	NK 2 PCR
9:	DNA PV 08 IT Dickdarm	18:	100 bp DNA-Ladder

Abbildung 19: Nested PCR von *Pogona vitticeps* PV 08 IT = fünftes infiziertes Tier

Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (←). Amplikons der gesuchten Größe von 270 bp konnten aus den Proben der Organe Magen, Dickdarm und Fettkörper gewonnen werden.

Bei den histopathologischen Untersuchungen der ausgewählten Organproben der Bartagamen, konnten bis auf die bei nahezu allen Bartagamen beobachtete gering- bis mittelgradige Glykogenspeicherung in der Leber keine histopathologischen Auffälligkeiten beobachtet werden. Die Proben PV 02 IT Dickdarm und PV 08 IT Dickdarm waren nicht auswertbar.

Alle ausgewählten in der In-situ-Hybridisierung untersuchten Proben (PV 02 IT Dünndarm, Fettkörper und Haut; PV 03 IT Trachea, Zunge, Dünndarm,

Dickdarm, Leber, Gonaden und Haut; PV 04 KT Trachea, Dünndarm und Fettkörper) waren sowohl mit der langen als auch mit der kürzeren IIV-Sonde negativ (Tabelle 33 im Anhang).

In keiner der 11 ausgewählten elektronenmikroskopisch untersuchten Organproben der Bartagamen (PV 02 IT Zunge, Trachea, Dünndarm, Dickdarm, Leber, Niere und Haut; PV 03 IT Trachea und Dickdarm; PV 05 IT Dickdarm und Niere) konnten eindeutig Viruspartikel nachgewiesen werden. In der Dünndarmprobe von PV 02 IT wurden einzelne Gebilde gefunden, bei denen es sich um defekte Viruspartikel im Darminhalt handeln könnte. In der Zunge von Bartagame PV 02 IT wurden ebenfalls mögliche Viruspartikel beobachtet, allerdings waren diese nicht eindeutig identifizierbar (Tabelle 33 im Anhang).

4.4.3.2 Tupferproben

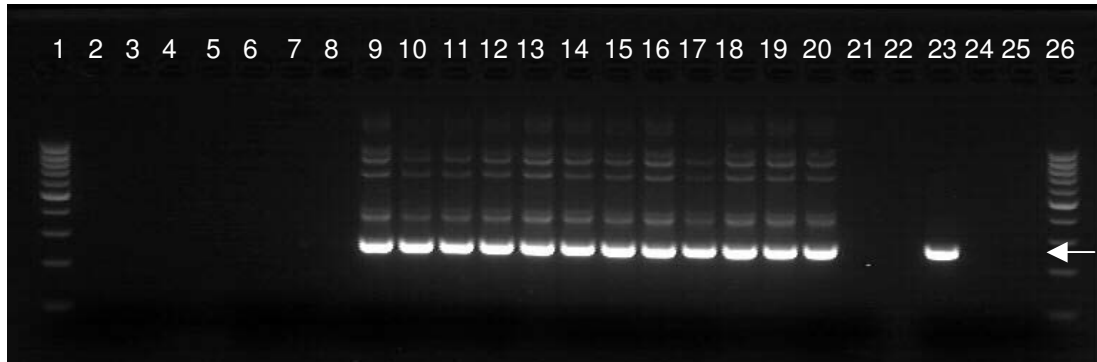
Tabelle 31: Übersicht der Tupferproben der *Pogona vitticeps* des Infektionsversuches

Tupferproben	Entnahmetag	Tage vor/nach Infektion
I	16.02.2005	15 v.l.
II	09.03.2005	06 n.l.
III	16.03.2005	13 n.l.
IV	23.03.2005	20 n.l.
V	30.03.2005	27 n.l.
VI	06.04.2005	34 n.l.
VII	13.04.2005	41 n.l.
VIII	20.04.2005	48 n.l.
IX	27.04.2005	55 n.l.
X	04.05.2005	62 n.l.
XI	11.05.2005	69 n.l.
XII	18.05.2005	76 n.l.
XIII	25.05.2005	83 n.l.

v.l. = vor Infektion; n.l. = nach Infektion

Bei dem Rachentupfer II der Bartagame PV 08 IT und dem Kloakentupfer II der Bartagame PV 09 IT vom 09.03.2005, die eine Woche nach Infektionsbeginn entnommen wurden, war auf VH-2 die Virusisolierung erfolgreich. Auf TH-1 konnte nach Filtration kein Virus isoliert werden. Umgekehrt war dies bei dem Rachentupfer II der Bartagame PV 03 IT der Fall. Insgesamt konnte auf Zellkultur bis zwei Wochen nach Infektionsbeginn ausschließlich bei infizierten Tieren Virus isoliert werden. Dabei waren auf TH-1 bei den Tupfern II vier Rachentupfer und bei den Tupfern III je ein Rachen- und Kloakentupfer positiv. Auf VH-2 konnte bei den Tupfern II bei sechs Proben und bei den Tupfern III bei einem Kloakentupfer Virus isoliert werden. Danach war auf keiner der beiden Zelllinien bei keinem der untersuchten Tupfer eine Virusisolierung mehr erfolgreich (Tabellen 36 bis 39 im Anhang).

Mit der nested PCR konnte in den Tupfern II vom 09.03.2005 (eine Woche nach der Infektion) virale DNA in den Rachen- und Kloakentupfern aller infizierten Bartagamen nachgewiesen werden. Bei den Negativkontrollbartagamen waren alle Tupfer negativ (Abbildung 20).



Legende

1:	100 bp DNA-Ladder	14:	DNA PV 05 KT Kloake
2:	DNA PV 04 KT Rachen	15:	DNA PV 06 KT Rachen
3:	DNA PV 04 KT Kloake	16:	DNA PV 06 KT Kloake
4:	DNA PV 07 KT Rachen	17:	DNA PV 08 KT Rachen
5:	DNA PV 07 KT Kloake	18:	DNA PV 08 KT Kloake
6:	DNA PV 10 KT Rachen	19:	DNA PV 09 KT Rachen
7:	DNA PV 10 KT Kloake	20:	DNA PV 09 KT Kloake
8:	NK 1 DNA-Präparation	21:	NK 2 DNA-Präparation
9:	DNA PV 02 KT Rachen	22:	leer
10:	DNA PV 02 KT Kloake	23:	PK PCR
11:	DNA PV 03 KT Rachen	24:	NK 1 PCR
12:	DNA PV 03 KT Kloake	25:	NK 2 PCR
13:	DNA PV 05 KT Rachen	26:	100 bp DNA-Ladder

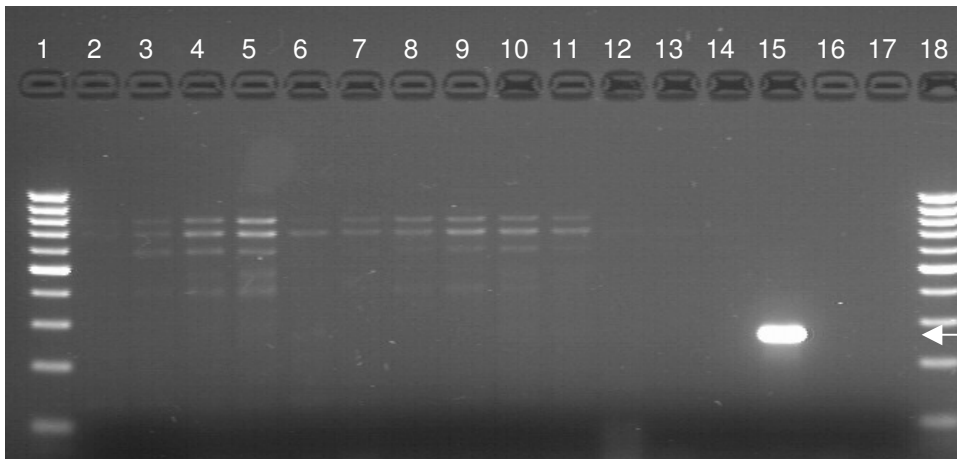
Abbildung 20: Nested PCR der Tupfer II vom 09.03.2005 *Pogona vitticeps*
Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (←).

Der Nachweis viraler DNA mit der nested PCR (Tabellen 34 und 35 im Anhang) war in einzelnen Proben bis Versuchsende (12 Wochen nach Infektion) möglich, wobei darunter bei den Tupfern XIII (83 Tage nach

Infektion) auch die vierte Negativkontrollbartagame PV 10 KT war. Diese Bartagame war zuvor schon einmal bei den Wiederholungsuntersuchungen der Tupfer I (15 Tage vor der Infektion) positiv. Acht der positiven Proben, darunter auch die von PV 10 KT, wurden sequenziert. Die dabei erhaltenen Sequenzen stimmten zu 100 % mit der entsprechenden Sequenz des Isolates 100/01 überein.

4.4.4 Untersuchungen bei zwei *Pogona vitticeps* der Reservegruppe

Die beiden Bartagamen PV 01 KTR und PV 02 KTR aus der Reservegruppe zeigten vom Schlupf bis zu Sektion zu keiner Zeit Auffälligkeiten in ihrem Verhalten. Bei der Sektion fiel bei Bartagame PV 01 KTR die mittelgradig ausgeprägte netzartig gelbliche Verfärbung der geringgradig brüchigen Leber auf. Diese erwies sich bei der histopathologischen Untersuchung als Glykogenspeicherung. Die Bartagame PV 02 KTR zeigte bei der Sektion keine pathologisch-anatomischen Auffälligkeiten. Bei keinem der jeweils 13 untersuchten Organe konnte mittels nested PCR Virus nachgewiesen werden.



Legende

1:	100 bp DNA-Ladder	10:	DNA PV 01 KTR Leber
2:	DNA PV 01 KTR Gehirn	11:	DNA PV 01 KTR Niere
3:	DNA PV 01 KTR Zunge	12:	DNA PV 01 KTR Gonaden
4:	DNA PV 01 KTR Trachea	13:	DNA PV 01 KTR Fettkörper
5:	DNA PV 01 KTR Lunge	14:	DNA PV 01 KTR Haut
6:	DNA PV 01 KTR Herz	15:	PK 100/01
7:	DNA PV 01 KTR Magen	16:	NK 1 PCR
8:	DNA PV 01 KTR Dünndarm	17:	NK 2 PCR
9:	DNA PV 01 KTR Dickdarm	18:	100 bp DNA-Ladder

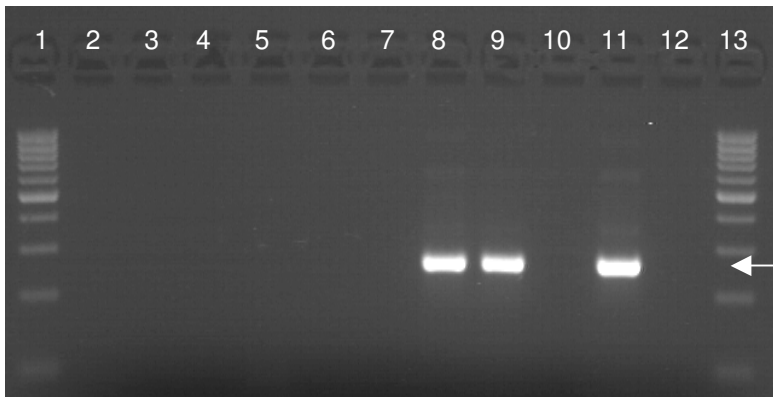
Abbildung 21: Nested PCR von *Pogona vitticeps* PV 01 KTR = erstes Tier aus der Reservegruppe

Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (←).

4.4.5 Weitere Untersuchungen bei den Eltern der *Pogona vitticeps* des Infektionsversuches

Die Ergebnisse der Zellkultur und der nested PCR aller Tupfer der Elterntiere, die 2005 und 2006 entnommen wurden, sind in Tabelle 40 im Anhang dargestellt. Aus den Rachen- und Kloakentupferproben konnte in keinem Fall Virus isoliert werden. Beim Rachen- und Kloakentupfer des Männchens vom 21.05.2005 (direkt nach der Eiablage des Weibchens 2005) konnte nach DNA-Präparation in der nested PCR DNA der gesuchten Größe

amplifiziert werden (Abbildung 22). Die weiteren Tupferproben waren negativ. Bei dem Weibchen konnte in der nested PCR bei keiner der Tupferproben Virus-DNA nachgewiesen werden.



Legende

1:	100 bp DNA-Ladder	8:	DNA m Rachen
2:	w Rachen Überstand	9:	DNA m Kloake
3:	w Kloake Überstand	10:	NK DNA-Präparation
4:	m Rachen Überstand	11:	PK 100/01
5:	m Kloake Überstand	12:	NK PCR
6:	DNA w Rachen	13:	100 bp DNA-Ladder
7:	DNA w Kloake		

Abbildung 22: Nested PCR der ersten Tupfer aus 2005 von den Elterntieren des Geleges II

Die gesuchte spezifische Bande hat ein Größe von 270 bp (←).

Die 2 Amplikons der ersten Tupfer des Männchens wurden sequenziert und die erhaltenen Sequenzen stimmten zu 100 % mit der entsprechenden Region des Isolates 100/01 überein.

In der Kotprobe vom 29.03.2005 konnte eine geringe Anzahl von Nematoden- und Milbeneiern gefunden werden. In der Kotprobe vom 29.03.2006 konnten keine Endoparasiteneier nachgewiesen werden.

4.4.6 Gelege 2005 von den Elterntieren der *Pogona vitticeps* des Infektionsversuches

Bei den drei untersuchten Eiern des Geleges 2005 der Elterntiere der Bartagamen des Infektionsversuches waren alle drei Schalen in der nested PCR positiv. Amplikons von zwei der drei positiven Schalen wurden zur Überprüfung der Spezifität sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen stimmten zu 100 % mit der entsprechenden Region des Isolates 100/01 überein. Die Proben der Embryonen und die Proben der Grillen aus der Zucht, die hier als Negativkontrollen dienten, waren in der nested PCR negativ.

5 DISKUSSION

5.1 IIV bei Invertebraten aus Futtertierzuchten

Seit Ende der 90er Jahre wurden immer wieder IIV-Infektionen in kommerziellen Insektenzuchten beschrieben. Bisher waren in diesen Zuchten Insekten der Spezies *Acheta domesticus*, *Gryllus assimilis*, *Gryllus campestris* und *Gryllus bimaculatus* betroffen (CALIS und ZWART, 1998; KLEESPIES et al., 1999; JUST und ESSBAUER, 2001). Nach Auskunft von Professor P. Zwart (persönliche Mitteilung) hat die bei CALIS und ZWART (1998) beschriebene niederländische Insektenzucht große Mengen von Insekten an verschiedene andere Zuchten in Europa weitergegeben. Dabei könnte es auch zu einer Verbreitung der IIV in Futtertierzuchten gekommen sein. Im Rahmen der Untersuchungen der Routinediagnostik des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim konnten aus Heimchen (*Acheta domesticus*), der Futtertierzucht eines Bartagamenzüchters (Bestand B), IIV isoliert werden. Zusätzlich konnten MARSCHANG et al. (persönliche Mitteilung) 2006 aus einer Futtertierzucht eines deutschen Skorpionhalters IIV aus *Acheta domesticus* und *Gryllus bimaculatus* isolieren. Infektionen mit IIV scheinen in Futtertierzuchten weiter verbreitet zu sein als bisher angenommen. Eine IIV-Infektion ist in der Regel mit einer hohen Mortalität in der betroffenen Invertebratenpopulation verbunden (CALIS und ZWART, 1998; KLEESPIES et al., 1999; JUST und ESSBAUER, 2001). Große kommerzielle Futtertierzuchten könnten versuchen, ein Massensterben der Tiere und die damit verbundenen finanziellen Einbußen durch Kontrolle der Einfuhrtiere in der Quarantänezeit zu verringern bzw. zu verhindern. Aber auch Echsenhalter, die Futtertiere zukaufen oder züchten, sollten bei erhöhter Mortalität der Insekten eine mögliche IIV-Infektion abklären.

Die Transmissionsversuche dieser Arbeit mit dem aus einem Chamäleon isolierten IIV-Isolat 100/01 haben gezeigt, dass ein aus einer Echse isoliertes IIV durch Dippen auf Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* übertragen

werden kann. Die statistische Auswertung aller Ergebnisse der nested PCR belegte dies eindeutig. Dabei verursachte 100/01 bei den infizierten Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* eine viel geringere Mortalitätsrate als dies von KLEESPIES et al. (1999) für das *Gryllus bimaculatus* Virus beschrieben wurde. Nach Dippen in Virussuspension lag die Mortalität bei 20 bis 40 % gegenüber 93 % bei KLEESPIES et al. (1999). Dafür könnten verschiedene Faktoren verantwortlich sein.

Das von KLEESPIES et al. (1999) eingesetzte Isolat stammte ursprünglich aus Invertebraten der Spezies *Gryllus campestris* und *Acheta domesticus*, die zusammen mit *Gryllus bimaculatus* zu der Ordnung der Orthoptera gehören. Das in dieser Studie eingesetzte Isolat 100/01 stammte dagegen ursprünglich aus einem Chamäleon. Es ist denkbar, dass das aus einer Echse isolierte Virus mutiert ist und daher weniger pathogen für Insekten ist. Um dies zu klären, sind weitere Untersuchungen am Genom notwendig. Herr DVM, MSc Tibor Papp aus dem Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim verglich einige IIV-Isolate aus Echsen untereinander und mit Isolaten aus Insekten in Bezug auf das MCP-Gen und das DNA-Polymerase-Gen. Diese Untersuchungen zeigen bisher, dass die Echsenisolate untereinander sehr ähnlich oder identisch sind. Jedoch unterscheiden sich diese Isolate zum Teil von den Insektenisolaten. Auch bei dem Fall aus der Routinediagnostik (Bestand B), bei dem sowohl Virus aus Futtertieren (*Acheta domesticus*) als auch aus Bartagamen zur Verfügung stand, waren Unterschiede in den Sequenzen des DNA-Polymerase-Gens feststellbar, obwohl auch das DNA-Polymerase-Gen hochkonserviert und daher unter Umständen weniger geeignet ist, Unterschiede zwischen nahe verwandten Viren zu erkennen. Vergleiche weiterer Sequenzen sind nötig, um bisherige Ergebnisse zu bestätigen und um die molekulare Epidemiologie dieser Viren aufzuklären.

In dieser Studie variierte die Dauer der drei Infektionsversuche mit Grillen zwischen 72 und 50 Tagen. Die von KLEESPIES et al. (1999)

durchgeführten Infektionsversuche liefen beide über 50 Tage. In dieser Zeitspanne wurde die höhere Mortalität erreicht. Die in dieser Studie höchste Mortalität lag bei 40 % in Infektionsversuch I und wurde innerhalb von 48 Tagen nach der Infektion erreicht. Mit 20 % lag die Mortalität in den von der Dauer des Versuches direkt mit KLEESPIES et al. (1999) vergleichbaren Infektionsversuchen II und III noch darunter. Ein möglicher negativer Einfluss der längeren Dauer des ersten Versuches ist daher unwahrscheinlich.

Unterschiede bei der Dauer des Dippens, in der Infektionsdosis und bei dem Titer der verwendeten Virussuspension könnten auch für die geringere Mortalität verantwortlich sein. Die Länge des Dippens lag in dieser Studie bei ca. 15 Sekunden gegenüber ca. 30 Sekunden bei KLEESPIES et al. (1999). Eine längere Verweildauer der Grillen in der Virussuspension könnte zu einer höheren Aufnahme von Virusmaterial führen. Allerdings ließ Frau Dr. R. G. Kleespies (mündliche Mitteilung) die Tiere nur in der Virussuspension schwimmen, ohne sie mit Gewalt unterzutauchen. Im Falle unserer Studie versuchten die Tiere nach kurzer Zeit am Rand des Laborglases hochzuklettern und der Virussuspension zu entkommen. Um dies zu verhindern, mussten die Tiere mit einer Pinzette in der Virussuspension zurückgehalten werden ohne sie zu verletzen. Um die Tiere nicht gewaltsam über längere Zeit unterzutauchen, wurde eine Verweildauer von 15 Sekunden gewählt. Auch ein höherer Titer der Virussuspension könnte zu einer höheren Infektionsdosis führen; allerdings sind die Angaben von $2,2 \times 10^{11}$ Virus-Partikel/ml (KLEESPIES et al., 1999) und von mindestens $10^{6,25}$ KID₅₀/ml nur bedingt vergleichbar. Daher kann keine Aussage über den genauen Unterschied zwischen den beiden Angaben gemacht werden. Wie das in dieser Studie eingesetzte Isolat 100/01 wurde das von KLEESPIES et al. (1999) in den Infektionsversuchen eingesetzte Isolat CrIV in Zellkultur vermehrt. Allerdings arbeiteten KLEESPIES et al. mit der Insekten-Zelllinie CF-124 von *Choristoneura fumiferana* und das Isolat 100/01 wurde in der Schildkröten-Zelllinie TH-1 von *Terrapene carolina* vermehrt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Einsatz einer Insekten-Zelllinie bei der

Vermehrung von IIV zu höheren Titern der erhaltenen Virussuspension führt. Bei der Haltung der infizierten Grillen auftretende Unterschiede wie z.B. Temperaturdifferenzen könnten ebenso verantwortlich sein. Das bei KLEESPIES et al. (1999) eingesetzte Temperaturregime von 25/20 °C bei Tag/Nacht konnte in dieser Studie nicht genau eingehalten werden. Da kein Klimaraum zur Verfügung stand, konnte die Temperatur nicht konstant gehalten werden (Abbildungen 5 bis 7). Daher wären weitere Versuche unter unterschiedlichen, definierten Umweltbedingungen nötig, um dies zu klären.

KLEESPIES et al. (1999) untersuchten die in den Infektionsversuchen eingesetzten Tiere nur mittels Histologie und Elektronenmikroskopie, zwei Untersuchungsmethoden, die unter anderen auch in dieser Studie angewandt wurden. Wenn man nur diese beiden Methoden betrachtet, war bemerkenswerter Weise mit der Grille III GB IT 14 ein Tier viruspositiv ohne zuvor Symptome oder Irideszenz zu zeigen oder zu sterben. Dass auch IIV-Infektionen, die nicht mit Irideszenz einhergehen, beobachtet wurden und die infizierten Insekten dabei gesund erscheinen und die Infektion nicht tödlich verläuft, wurde auch schon von CONSTANTINO et al. (2001) beschrieben. Besonders bemerkenswert sind außerdem drei Fälle von Grillen (zwei in Infektionsversuch I und eine in Infektionsversuch III), die in der Sektion bei Versuchsende die typische bläuliche Irideszenz aufwiesen, ohne daran gestorben zu sein. Die Tiere zeigten zuvor keine Auffälligkeiten. Diese hochgradig infizierten Tiere, die eine enorme Menge an Viruspartikeln beherbergen, die die Irideszenz erst möglich machen, könnten für eine Übertragung und Verbreitung von IIV verantwortlich sein. Bei ihrer Einfuhr in naive Zuchten können sie andere Invertebratenkolonien infizieren. Die Tatsache, dass solche Tiere lebend nicht als infiziert erkannt werden können, erschwert die Identifikation und Auslöschung einer IIV-Infektion in einer Invertebraten-Futtermittelzucht erheblich. Es erscheint am wahrscheinlichsten, dass klinisch inapparente Virusträger mit einem hohen Virusgehalt Vertebraten infizieren können, wenn sie an insektivore Reptilien verfüttert werden.

Bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse der drei Infektionsversuche mit den Grillen fiel ein signifikanter Unterschied der Infektionsraten auf. Für diesen Unterschied können verschiedene Faktoren verantwortlich sein. In dieser Studie variierte die Dauer der drei Infektionsversuche zwischen 72 und 50 Tagen. Es könnte sein, dass die längere Dauer des ersten Infektionsversuches für die höhere Infektionsrate verantwortlich ist. Allerdings wurden die Tiere nur einmalig gedippt und eine Reinfektion durch Einzelhaltung ausgeschlossen. Unterschiede bei den eingesetzten Tieren und ihrem Alter, bei den für die Infektion der Grillen verwendeten Aliquots des Isolates, der Länge des Dippens oder beim Temperaturverlauf der verschiedenen Versuche, können ebenso verantwortlich sein.

Alle in den Versuchen eingesetzten Grillen stammten aus der gleichen IIV-freien Zucht und hatten zu Beginn der einzelnen Versuche etwa das gleiche Alter. Ein minimaler Einfluss auf die Infektionsrate kann nicht ausgeschlossen werden, aber es handelte sich um vergleichbare Tiere. Für alle drei Infektionsversuche wurden Aliquots der gleichen Passage des IIV-Isolates des Chamäleons eingesetzt. Allerdings variierten bei Versuchsbeginn die Titer der Virussuspension des Iridovirusisolates 100/01 zwischen einer KID_{50}/ml von $10^{7,25}$ (Versuch I), KID_{50}/ml von $10^{6,5}$ (Versuch II) und KID_{50}/ml von $10^{6,25}$ (Versuch III). Ein direkter Einfluss des Titers der Virussuspension auf die Infektionsrate ist nicht sehr naheliegend. Es handelt sich um kleine Unterschiede. Bei einem Vergleich korreliert die Infektionsrate nicht direkt mit der Titergröße, da Infektionsversuch III mit dem niedrigsten Titer nicht die kleinste Infektionsrate aufweist. Die Länge des Dippens lag bei ca. 15 Sekunden. Ein minimaler Einfluss auf die Infektionsrate kann nicht ausgeschlossen werden, da einzelne Tiere sehr wehrhaft waren und sich so minimal länger oder kürzer in der Virussuspension befanden. Die variabelste Größe im Verlauf der drei Infektionsversuche war die Haltungstemperatur, da diese aus Ermangelung eines Klimaraumes nur bedingt konstant gehalten werden konnte. Ein Vergleich der absoluten Temperaturen in allen drei Versuchen zeigt, dass während Infektionsversuch I (mit der höchsten

Infektionsrate) die höchste Minimum- (21,0 °C) und niedrigste Maximum- (28,1 °C) Temperatur gemessen wurde. Das bedeutet, dass die Temperatur innerhalb eines engen Bereiches relativ konstant blieb. Im Gegensatz dazu konnte während des Infektionsversuchs II (mit der niedrigsten Infektionsrate) die niedrigste Minimum- (18,9 °C) und höchste Maximum- (31,2 °C) Temperatur gemessen werden. In diesem Versuch variierte die Temperatur am meisten. Da der Ausgang einer Virusinfektion sowohl von der Vermehrung der Viren als auch von der Immunabwehr des Wirtes abhängt, die beide temperaturabhängig sind, spielt die Temperatur eine große Rolle. Es wäre möglich, dass es bei 23,8 °C Durchschnittstemperatur aus Infektionsversuch I zu einer optimalen Vermehrung der Viren bei minimaler Immunabwehr der Grillen kam. Doch auch der gemessene Temperaturbereich könnte eine große Rolle spielen. Im Falle einer großen Empfindlichkeit gegenüber Temperaturschwankungen könnte in einem Infektionsversuch mit weniger Temperaturschwankungen die höchste Infektionsrate erreicht werden. Nach BELETT et al. (1968) liegt die optimale Temperatur für die Vermehrung von Iridoviren, darunter auch die Typspezies des Genus *Iridovirus* (IIV-6), zwischen 20 und 25 °C, je nach Wirt und Versuchsbedingungen. Bei 28 °C wird die Synthese von viralen Komponenten und die Produktion von infektiösen Viren gehemmt. Bei 30 bis 35 °C ist die Infektion offenbar vollkommen erfolglos. WILLIAMS (1996) bestätigt, dass die Replikation von IIV bei Temperaturen über 30 °C gehemmt wird, was den feuchten Habitaten und niedrigen Körpertemperaturen der Mehrheit ihrer ektothermen Wirte entspricht. Alle bisherigen Isolierungen von IIV aus Insekten aus Futtertierzuchten waren bis 28 °C erfolgreich (KLEESPIES et al., 1999; JUST und ESSBAUER, 2001).

Bei einem Vergleich der gemessenen Maximum-Temperaturen in den drei Infektionsversuchen (Abbildung 5, 6 und 7) fällt auf, dass es nur während Infektionsversuch II häufig zu einer Überschreitung von 28 °C kam. Die Maximum-Temperaturen in Infektionsversuch I und II liegen in der Regel unter 27 °C; allerdings lagen diese in Versuch III zu Beginn des Versuches

darüber. Die Überschreitung von bestimmten oberen Temperaturgrenzen, vor allem am Tag der Infektion, könnte für die Unterschiede in den Infektionsraten verantwortlich sein. Über den genauen Einfluss der Haltungstemperatur auf die Immunantwort von Insekten bzw. Grillen sind keine Daten bekannt. Zukünftige Studien sollten bei konstanten Temperaturen, am besten in einem Klimaraum, durchgeführt werden.

5.2 Bedeutung von IIV bei Reptilien

Seit 1998 wurden IIV aus Echsen der Spezies *Chamaeleo quadricornis*, *Chamaeleo hoehnelii*, *Chlamydosaurus kingii*, *Iguana iguana* und *Pogona vitticeps* (JUST et al., 2001; MARSCHANG et al., 2002) isoliert. Im Rahmen der Untersuchungen der Routinediagnostik des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim konnten IIV aus weiteren Bartagamen aus zwei Beständen isoliert werden. Bei zwei Bartagamen eines anderen Echsenhalters konnten 2006 durch MARSCHANG et al. (persönliche Mitteilung) IIV mit der nested PCR nachgewiesen werden. Bisher konnte die Frage, ob die aus Echsen isolierten IIV für die betroffenen Tiere ein pathogenes Potential besitzen und die gefundenen IIV ursprünglich von oral aufgenommenen infizierten Insekten stammten nicht geklärt werden. In den meisten Fällen wurden IIV bei toten Echsen nachgewiesen. Viele Echsen waren kachektisch und bei einzelnen Echsen wurden auch Hautveränderungen gefunden.

5.2.1 Mögliche Übertragungswege von IIV auf Echsen

Nach den Funden von IIV in kommerziellen Grillenzuchten (KLEESPIES et al., 1999; JUST und ESSBAUER, 2001) und bei Echsen (JUST et al., 2001; MARSCHANG et al., 2002) wird angenommen, dass die Übertragung von IIV auf insektivore Reptilien über infizierte Futterinsekten erfolgt. Für diese These gibt es aber bis heute noch keine Beweise. Bei Invertebraten aus Futtertierzuchten konnte eine orale Infektion mit Viren des Genus *Iridovirus* experimentell bestätigt werden (KLEESPIES et al., 1999). Einige andere

Vertreter der Familie *Iridoviridae* wurden erfolgreich oral auf ektotherme Wirte (WOLF et al., 1968; MOODY und OWENS, 1994) übertragen oder es wird eine orale Infektion angenommen (FRASER et al., 1993).

Da bei einigen Echsen Hautläsionen beobachtet wurden, kann auch eine mechanische Infektion über infizierte stechende oder beißende Invertebraten in Frage kommen. Das afrikanische Schweinepest Virus (ASPV; *Asfarviridae*, Genus *Asfivirus*) wurde ursprünglich als ein Mitglied der Familie *Iridoviridae* klassifiziert. Für das ASPV, das eindeutige morphologische Ähnlichkeiten mit Iridoviren aber eine andere Genomorganisation hat, gibt es einen Transmissionskreislauf, der Vertebraten und Invertebraten einschließt. Das Virus kann durch Kontakt, infiziertes Fleisch und mechanisch durch stechende Fliegen und Zecken der Ordnung Ornithodoros auf Schweine übertragen werden (DIXON et al., 2005). BASTO et al. (2006) konnten aus Zecken der Spezies *Ornithodoros erraticus* noch 63 Wochen nach einem Ausbruch in Portugal ASPV isolieren. Auch bei den Iridovirus-ähnlichen Erythrocytic Necrosis Viren gibt es Überlegungen, ob bei den Lizard erythrocytic viruses nicht doch eine mechanische Übertragung durch stechende Insekten in Frage kommt (ALVES DE MATOS persönliche Mitteilung).

5.3 Proben aus der Routinediagnostik

Die drei in der Routinediagnostik des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim diagnostizierten IIV Infektionen bei Echsen traten alle bei Bartagamen (*Pogona vitticeps*) auf. Im Fall des Einzeltieres aus Bestand A, der Bartagame mit *Opisthotonus*, ist vorberichtlich nicht viel bekannt. Bemerkenswerter Weise konnte in diesem Fall auf Zellkultur IIV aus dem Rachentupfer isoliert werden. Die Isolierung von infektiösen Viruspartikeln aus dem Rachentupfer im Zusammenhang mit dem Tod des betroffenen Tieres könnte auf ein pathogenes Potential der IIV für Echsen hinweisen. Möglich ist allerdings auch, dass es sich bei den nachgewiesenen

infektiösen IIV um noch in der Mundhöhle vorhandene Viren aus Futtertieren handelte, die nicht mit dem Tod des Tieres in Zusammenhang standen.

Im Gegensatz zu der Information zu Bestand A war der Vorbericht, den der Besitzer des Bestandes B geben konnte, sehr ausführlich. Diese Informationen legen einige Annahmen nahe. Es scheint möglich zu sein, dass IIV nur unter bestimmten Umständen für Echsen pathogen sind. In Bestand B, in dem eine Mortalität von ca. 80 % beobachtet werden konnte, waren nur Jungtiere betroffen, die zudem bei relativ niedrigen Temperaturen gehalten wurden. Diese Tiere wurden zuvor mit infizierten Heimchen (*Acheta domesticus*) gefüttert. Scheinbar wurde den jungen Bartagamen über längere Zeit über das Futter eine große Virusmenge zugeführt. Es handelte sich in Bestand B also um junge Bartagamen, die bei niedrigen Temperaturen gehalten wurden und über längere Zeit einer hohen oralen Virusbelastung ausgesetzt waren.

Bei den zwei Bartagamen eines weiteren Echsenhalters, bei denen MARSCHANG et al. (persönliche Mitteilung) im Jahr 2006 mit der nested PCR IIV nachweisen konnten, handelte es sich um zwei Tiere, die zusammen gehalten wurden. Das genaue Alter der beiden Tiere ist unbekannt. Ein Tier war plötzlich gestorben. Zwei Tage vor dem Tod war das Tier apathisch, nahm kein Futter auf. Proben von Lunge, Herz, Leber, Niere und Ovidukt wurden eingeschickt und mit der nested PCR und auf Zellkultur untersucht. In der nested PCR konnten bei den Proben der Lunge und des Oviduktes PCR-Produkte der gesuchten Größe amplifiziert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen auf Zellkultur waren negativ. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden Rachen- und Kloakentupfer des zweiten Tieres untersucht. In der nested PCR konnten bei beiden Proben PCR-Produkte der gesuchten Größe amplifiziert werden. Die Ergebnisse der Untersuchungen auf Zellkultur waren wieder negativ. Ob der Tod des einen Tieres mit den IIV zusammenhing, konnte nicht geklärt werden. Ein positives Ergebnis in der nested PCR ohne Virusisolierung ist wenig aussagekräftig und nur ein Hinweis. Der positive Nachweis von IIV in den Tupfern des zweiten Tieres

kann in der Aufnahme infizierter Futtertiere begründet sein oder für eine Infektion des Tieres mit IIV und deren Ausscheidung sprechen. Da keine Organproben des Tieres untersucht werden konnten, war nicht zu klären, ob es Hinweise auf eine systemische Verbreitung der IIV gibt. Infektionen mit IIV scheinen in Bartagamen weiter verbreitet zu sein als bisher angenommen. Bartagamen gehören zu den Echsen, die relativ einfach zu halten sind und bei europäischen Züchtern sehr weit verbreitet sind. Es kann noch keine Aussage über die Prävalenz der IIV bei Bartagamen getroffen werden.

5.4 Übertragungsversuche mit dem Isolat 100/01 auf Echsen der Spezies *Pogona vitticeps*

Der Transmissionsversuch mit dem Isolat 100/01 hat nicht gezeigt, ob ein aus einem Chamäleon isoliertes IIV über Futtertiere der Spezies *Gryllus bimaculatus* oral auf Echsen der Spezies *Pogona vitticeps* übertragen werden kann. Bis zum Ende des Infektionsversuches mit Bartagamen war kein Tier gestorben. Bei der Untersuchung der Organe, der mit IIV-haltigen Grillen infizierten *Pogona vitticeps*, mit der nested PCR wurden insgesamt bei fünf der sechs infizierten Bartagamen und bei drei der vier Negativkontrollbartagamen positive Ergebnisse ermittelt. Für die Abgeschlagenheit der Bartagamen PV 03 IT und PV 05 IT konnten keine direkten Ursachen ermittelt werden. Die beobachtete Reduktion des Allgemeinbefindens könnte durch eine Abwehrreaktion des Körpers auf die orale Zufuhr der IIV hervorgerufen worden sein. Bei Organen, die während der Magen-Darm-Passage durchlaufen werden, könnte ein Restgehalt an Virus von den verfütterten infizierten Grillen und der verabreichten Virussuspension vorhanden gewesen sein. Bei Tier PV 08 IT könnte das Kümern und die Abgeschlagenheit nach Lebendfutterverabreichung auf eine Beeinträchtigung durch das muskelstarke Herz oder eine Abwehrreaktion auf die IIV zurückzuführen sein.

Für die Tatsache, dass IIV auch in Organproben von Negativkontrolltieren nachgewiesen werden konnte, gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Bei

den Ergebnissen der nested PCR könnte es sich um falsch positive Ergebnisse handeln. Die Amplikons der nested PCR könnten PCR-Produkte der gesuchten Größe aber keine IIV sein. Dagegen spricht, dass alle vier stichprobenartig ausgesuchten PCR-Produkte, die sequenziert wurden, zu 100 % die gesuchte Nukleotidsequenz aufwiesen.

Bei der Gewinnung, Bearbeitung und Untersuchung der Organproben mit der nested PCR könnte es zur Kontamination mit IIV gekommen sein. Falsch positive Ergebnisse sind zwar möglich, insbesondere da keine andere der eingesetzten Nachweismethoden (Virusisolierung, Histologie, Elektronenmikroskopie und In-situ-Hybridisierung) positive Ergebnisse lieferte. Allerdings sind diese Methoden alle weniger sensitiv als die eingesetzte nested PCR. Die zur Sicherheit sowohl bei der DNA-Präparation als auch bei beiden Runden der nested PCR eingesetzten Negativkontrollen waren alle negativ, was gegen Kontaminationen spricht.

Bei der Fütterung und Haltung der Bartagamen des Infektionsversuches kann es zur Kontamination der Negativkontrollbartagamen, durch nicht IIV-freie Grillen oder durch Übertragung über die Luft, gekommen sein. Dagegen spricht, dass die Grillenzucht durch regelmäßige Untersuchungen in ihrer IIV-Freiheit bestätigt wurde. Gegen eine Übertragung über die Luft sprechen zum einen die Ergebnisse der Transmissionsversuche mit den Grillen. Dabei waren alle Negativkontrollgrillen mit allen Untersuchungsmethoden Virusnegativ, obwohl die Grillen im selben Raum gehalten wurden. Im Falle des Bartagameninfektionsversuches wurden die Bartagamen als zusätzliche Vorsorgemaßnahme in getrennten Räumen gehalten. Zum anderen waren alle Untersuchungen mit der nested PCR an zwei Bartagamen-Reservetieren, die andere Elterntiere hatten, aber unter den gleichen Bedingungen im selben Raum wie die Negativkontrollbartagamen gehalten wurden, ebenfalls negativ.

Nicht ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, dass die Bartagamen schon vor Versuchsbeginn durch ihren Vater infiziert wurden. Eine vertikale Infektion in den Eiern oder eine Infektion über kontaminierte Eischalen, wobei sich die Bartagamen beim Schlupf infizieren könnten, kommt in Frage. Für diese Möglichkeit spricht, dass bei dem Vater der Bartagamen des Übertragungsversuches einmalig Virus in Rachen- und Kloakentupfer (Tupfer vom 21.05.2005) nachgewiesen werden konnte und bei den drei untersuchten Schalen der von den gleichen Eltern bezogenen Kontroll-Eier (Legedatum 15.05.2005) ebenfalls in der nested PCR Virus nachgewiesen werden konnte. Allerdings könnte dieses positive Ergebnis auch durch die Aufnahme infizierter Futtertiere verursacht worden sein. Da die beiden Elterntiere in einem Terrarium gehalten werden, fressen sie das gleiche Futter. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Männchen infizierte Futtertiere aufgenommen hat und das Weibchen nicht. Da die nested PCR erst im Laufe dieser Versuche entwickelt wurde, konnte nicht mehr geklärt werden, ob in den Tupferproben der Elterntiere auch vor Versuchsbeginn DNA von IIV vorhanden war.

Die Tatsache, dass die Tupferproben XIII von PV 10 KT (der vierten Negativkontrolle) vom 25.05.2006 positiv sind, aber die Untersuchungen der am selben Tag entnommenen Organe negativ, konnte nicht erklärt werden. Eine Kontamination der Tupferproben kann nicht ausgeschlossen werden, ist aber wie die der Organproben unwahrscheinlich. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Tiere verschiedene Phasen der Ausscheidung durchlaufen, so dass es nicht immer zu positiven Tupferergebnissen bei infizierten Tieren kommen muss. Zum anderen muss der Virusgehalt nicht homogen in den untersuchten Organen verteilt sein. Da bei der Sektion keine Veränderungen auffielen, die im Zusammenhang mit einer Virusinfektion stehen könnten, ist es möglich, dass bei der Probennahme keine infizierten Bereiche entnommen wurden. Das bedeutet aber nicht zwingend, dass das untersuchte Tier virusfrei war.

Die PCR-Ergebnisse der Tupferproben von PV 10 KT und der Organproben der anderen Bartagamen zeigen, dass diese Tiere möglicherweise persistent infiziert sein könnten. Virale DNA konnte in den Organen bis Ende der Versuche (12 Wochen) nachgewiesen werden (PV 09 IT). Die Möglichkeit einer Persistenz wurde auch schon bei anderen Vertretern der Familie *Iridoviridae* wie das Bohle iridovirus (Genus *Ranavirus*) bei Amphibien (CULLEN und OWENS, 2002) in Erwägung gezogen. Bei Fischen konnten unter klinisch unauffälligen Adulten zwei Trägertiere für das Epizootic haematopoietic necrosis virus (Genus *Ranavirus*) entdeckt werden (LANGDON und HUMPHREY, 1987).

5.5 Pathogenität von IIV für Echsen

Bisher kann noch keine eindeutige Aussage zur Pathogenität von IIV bei Echsen getroffen werden. Bei den infizierten Bartagamen dieser Studie konnten neben Abgeschlagenheit und vermindertem Appetit keine Auffälligkeiten beobachtet werden. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen Fällen, in denen IIV von Echsen isoliert und charakterisiert wurden, konnten bisher plötzlicher Tod, Abmagerung, Läsionen der Haut und eine Pneumonie beobachtet werden (JUST et al., 2001; MARSCHANG et al., 2002). Eine eindeutige Zuordnung zu einem Krankheitsgeschehen ist allerdings nicht möglich; es kommen vielfältige weitere Ursachen in Frage. Bisher ist unklar, ob die Infektion mit IIV für den plötzlichen Tod der betroffenen Echsen verantwortlich war oder nur ein Zufallsbefund ist. Auch die Fälle aus der Routinediagnostik der Virologie des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim weisen keine eindeutig für eine IIV Infektion möglichen pathognomischen Symptome auf.

Wie frühere Untersuchungen gezeigt haben kann IIV-6, die Typspezies des Genus *Iridovirus*, eine Hepatitis bei Mäusen verursachen und zum Tod der infizierten Mäuse führen. Dabei vermehren sich die Viren nicht in diesen Tieren. Der Tod der Tiere ist auf einen toxischen Effekt der Viren zurückzuführen (BINGEN et al., 1982; LORBACHER DE RUIZ et al., 1986).

Untersuchungen von BINGEN et al. (1982) haben gezeigt, dass ein Strukturprotein für diese toxische Effekte verantwortlich sein muss. Es ist unklar, ob eventuell toxische Effekte eine Rolle beim Tod der Echsen gespielt haben könnten.

Die noch lebenden Bartagamen, bei denen IIV mit der nested PCR in Tupferproben nachgewiesen werden konnten, aber die Virusisolierung auf Zellkultur erfolglos blieb, erscheinen klinisch gesund. Auch das Vatertier der Bartagamen des Infektionsversuches zeigt außer mangelhafter Gewichtszunahme keinerlei Auffälligkeiten. Die Gewichtsprobleme können aber auch durch den nachgewiesenen Befall mit Endoparasiten hervorgerufen worden sein.

5.5.1 Einfluss des Alters der Tiere

Das Alter der Echsen, bei denen bisher IIV isoliert werden konnten, ist nur teilweise bekannt. Die bei JUST et al. (2001) und MARSCHANG et al. (2002) beschriebenen Tiere wurden in Bezug auf ihr Alter nicht näher definiert. In Bestand B, in dem eine Mortalität von 80 % beobachtet werden konnte, handelte es sich um zwei bis drei Monate alte Jungtiere. Die Tiere im Infektionsversuch dieser Studie waren zu Beginn des Versuches ca. acht Monate alt. Das verheerendste Ausmaß von Symptomen im Zusammenhang mit der Isolierung von IIV konnte daher bisher bei einer Gruppe von Jungtieren beobachtet werden. Bisher konnte nicht geklärt werden, ob das Alter der Tiere eine Rolle bei der Infektion mit IIV spielt. Bei anderen Vertretern aus der Familie *Iridoviridae* gibt es Hinweise darauf, dass das Alter eine große Rolle bei der Infektion und dem folgenden Ausmaß der Symptome und dem Ausgang der Krankheit spielt. Besonders bei Ranavirusinfektionen bei Fischen wurde immer wieder berichtet, dass sie vermehrt bei juvenilen Tieren auftreten oder zumindest durch eine höhere Mortalität gekennzeichnet sind (LANGDON et al., 1986; LANGDON und HUMPHREY, 1987; AHNE et al., 1989; SCHUH und SHIRLEY, 1990; MONINI und RUGGERI, 2002). Auch bei Schildkröten und Schlangen

handelte es sich bei den von einer Ranavirusinfektion betroffenen Tieren um Jungtiere (MARSCHANG et al., 1999; CHEN et al., 1999; HYATT et al., 2002).

5.5.2 Einfluss der Temperatur

Die Virusisolierung von IIV bei Echsen war bei JUST et al. (2001) bei 28 °C auf VH2 und bei MARSCHANG et al. (2002) bei 28 °C auf verschiedenen Zelllinien erfolgreich. Die Isolate aus der Routinediagnostik wurden bei 28 °C auf TH-1 und VH-2 gewonnen. Die bereits erwähnten Untersuchungen zur optimalen Vermehrungstemperatur von Iridoviren unter anderem IIV-6 ergaben, dass bei Temperaturen über 30 °C die Replikation von IIV gehemmt wird (BELLET, 1968; WILLIAMS, 1996). Untersuchungen von FV-3, der Typspezies des Genus *Ranavirus*, belegen, dass sich dieses nur bei Temperaturen unter 33 °C vermehrt (GRAVELL und GRANOFF, 1970; CORDIER et al., 1986; CHINCHAR, 2002). Bei höheren Temperaturen wird kein infektiöses Virus mehr produziert, obwohl noch Synthese von virus-spezifischen Makromolekülen stattfindet (CHINCHAR, 2002). Diese Untersuchungen zeigen, dass im Zusammenhang mit einer IIV-Infektion bei ektothermen Wirten eine Überschreitung einer gewissen Temperatur die Produktion von infektiösen Viren hemmen könnte. Nicht ausgeschlossen werden kann die Möglichkeit, dass es bei den Bartagamen des Infektionsversuches zwar zur Produktion viraler DNA, wie dem MCP-Gen kam, das in der nested PCR nachgewiesen werden konnte, aber nicht zur Produktion infektiöser Viruspartikel. Ein Einfluss der Temperatur auf die Transmissionsstudie könnte sich auch dadurch erklären lassen, dass das Immunsystem von Reptilien ebenfalls temperaturabhängig ist und nur bei optimalen Temperaturen optimal funktioniert (EVANS und COWLES, 1959; AVTALION et al., 1976; COOPER et al., 1985). Nach dem Gutachten über die Mindestanforderungen an die Haltung von Reptilien (Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten, Referat Tierschutz; 10.01.1997) liegt die optimale Haltungstemperatur von Bartagamen bei einer Grundtemperatur von 25 bis 30 °C mit lokalen Sonnenplätzen bis zu 50 °C.

Bartagamen können ihre Körpertemperatur schnell an die herrschende Umgebungstemperatur angleichen (BARTHOLOMEW und TUCKER, 1963). Ein erwärmtes Reptil kann Hitze speichern und die höhere Körpertemperatur für eine längere Zeitspanne als die Aufwärmzeit, aufrechterhalten (DEVOSJOLI et al., 2001). Da sich Bartagamen gerne auf den Sonnenplätzen aufhalten, liegt ihre Körpertemperatur daher während des Tages durchaus über 30 bzw. 33 °C. In Bestand B wurden die Tiere nach Auskunft des Besitzers bei einer Umgebungstemperatur von 24 bis 27 °C (am wärmsten Punkt) und lokalen Sonnenplätzen in 25 bis 55 cm Höhe mit 37 bis 38 °C gehalten. Ein negativer Einfluss der niedrigeren Haltungstemperatur in Bestand B auf das Immunsystem der Tiere, der in der hohen Mortalität von 80 % resultiert, wird angenommen.

5.6 Nachweismethoden

Statistische Vergleiche zeigten, dass die Ergebnisse der Methoden nested PCR, Zellkultur, Histologie, ISH und Elektronenmikroskopie vergleichbar waren. Proben, die mit den weniger sensitiven Untersuchungsmethoden positiv waren, waren auch mit den sensitiveren positiv, was eine hohe Spezifität der Methoden belegt.

Auf den Ergebnissen der Infektionsversuche basierend ist die nested PCR die sensitivste Methode, um eine Iridovirusinfektion bei Grillen festzustellen. Sie ist nicht so zeitintensiv wie die Zellkultur, die Histologie, die ISH und die Elektronenmikroskopie, aber weitaus spezifischer. Allerdings handelt es sich um eine nested PCR, die ein höheres Risiko für Kontaminationen birgt und außerdem kosten- und zeitintensiver ist als eine PCR mit nur einem Reaktionsschritt. Diese PCR muss sehr sorgfältig unter Vermeidung von Kontaminationsmöglichkeiten im Labor durchgeführt werden, vor allem, da viele der untersuchten Fettkörperproben eine große Menge an Virus beinhalten.

Die bei der histologischen Untersuchung in den Adipozyten beobachteten basophilen Schollen korrespondieren mit der ultrastrukturellen Darstellung von Iridoviruspartikeln im Zytoplasma dieser Zellen und teilweise mit dem Nachweis iridoviraler Nukleinsäuren (DNA und mRNA) durch die In-situ-Hybridisierung. Aus diesen Beobachtungen wird gefolgert, dass es sich bei diesem morphologischen Substrat um das lichtmikroskopische Äquivalent der Iridoviren handelt.

5.7 Empfehlungen für die Diagnostik im Labor

Für die Routinediagnostik in einem virologischen Labor ergeben sich durch diese Studie Verbesserungen aber noch keine zufriedenstellenden Untersuchungsmethoden. Falls in einem Echsenbestand die Futtertiere in die virologischen Untersuchungen einbezogen werden können, ist dies unbedingt anzuraten, um weitere Anhaltspunkte für die möglichen Übertragungswege zu bekommen. Eingeschickte Insekten können in toto weiterverarbeitet oder in einer Sektion der Fettkörper gewonnen werden. Der Vergleich der verschiedenen angewandten Untersuchungsmethoden bei den Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* hat gezeigt, dass die nested PCR mit Abstand die sensitivste Methode ist. Es sollte allerdings auch immer versucht werden das Virus auf Zellkultur zu isolieren, um dessen Infektiösität zu bestätigen. Ideal wäre eine Sequenzierung der nested PCR-Produkte, um die Ergebnisse der nested PCR zu bestätigen. Falls noch lebende Echsen betroffen sind und Rachen- und Kloakentupfer eingeschickt werden, muss beachtet werden, dass, wie im Falle des männlichen Elterntieres der Bartagamen des Infektionsversuches und der Bartagamen des Infektionsversuches selbst, nicht immer IIV nachgewiesen werden können. Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Tiere möglicher Weise Phasen der Ausscheidung und Phasen ohne Ausscheidung von IIV durchlaufen. Bisher kann noch keine Aussage darüber getroffen werden, welche Faktoren eine Ausscheidung beeinflussen könnten. Daher ist nur ein positives Ergebnis ein Hinweis und sollte auf jeden Fall durch Virusisolierung ergänzt werden. Zum anderen darf nicht außer Acht gelassen werden, dass positive Ergebnisse

von Rachen-Tupferproben nicht zwingend eine Infektion mit IIV belegen. Die nachgewiesenen IIV können ebenso von aufgenommenen infizierten Futtertieren stammen. IIV-positive Kloaken-Tupferproben belegen eine Magen-Darm-Trakt-Passage. Im Falle von toten Tieren, von denen Organproben gewonnen werden können, waren in unserem Infektionsversuch Haut, Trachea und Dünndarm am meisten Virus-positiv. Allerdings konnte bei jedem der 13 entnommenen Organe zumindest bei einem Tier virale IIV-DNA mit der nested PCR detektiert werden.

In den letzten Jahren wurden IIV zunehmend bei Echsen beschrieben. Das Auftreten dieser Viren in Echsen wurde bisher durch Virusisolation und anschließende Virusidentifikation bewiesen. Diese Methoden sind zeit- und kostenintensiv. Die in dieser Studie entwickelten Methoden könnten helfen, die Sensitivität und Geschwindigkeit, mit der eine solche Diagnose gestellt werden kann, zu verbessern. Die Tatsache, dass Invertebratenviren auf Vertebraten übertragen werden können, vergrößert die Bedeutung von Untersuchungsmethoden zum Screening der kommerziellen Produktion von Futtertierinsekten.

5.8 Empfehlungen für die Praxis

Bei Echsen sollte beim Auftreten von Symptomen, die nicht eindeutig einer bekannten Erkrankung zugeordnet werden können oder deren Ursache nicht geklärt werden kann und bei plötzlichen Todesfällen oder multiplen Hautveränderungen ohne erkennbare Ursache eine Infektion mit IIV in Erwägung gezogen werden. Wenn es sich um insektivore Spezies handelt, ist die Einbeziehung der Quelle der Futterinsekten in die Anamnese und eventuell gar in die virologischen Untersuchungen ratsam. Besonders wenn eine erhöhte Mortalität bei der Futtertierzucht erkennbar ist, muss eine mögliche IIV-Infektion ausgeschlossen oder bestätigt werden.

5.9 Empfohlene weiterführende Untersuchungen

Für die Zukunft ist die Entwicklung einer PCR, ohne nested Schritt, die genauso sensitiv ist, aber eine robustere, schnellere und billigere Methode darstellt, für die Routinediagnostik zu empfehlen. Im Anschluss an diese Forschungsarbeiten sollte ein zweiter Infektionsversuch mit Bartagamen durchgeführt werden, der alle bisher gewonnenen Erkenntnisse berücksichtigt. Eine Wiederholung des Infektionsversuches mit Bartagamen sollte mit wesentlich jüngeren Tieren erfolgen. Die Tiere sollten bei niedrigeren Temperaturen gehalten werden. Die orale Zufuhr von infektiösen Grillen sollte über einen wesentlich längeren Zeitraum stattfinden. Ein weiterer Versuch ist nötig, um die mögliche Pathogenität der IIV für Echsen zu klären. Ein Wirtswechsel von Iridoviren bleibt sowohl für die Tiermedizin und die Herpetologie als auch für die Virologie eine wichtige Frage. IIV scheinen bei Echsen weiter verbreitet zu sein, als bisher angenommen. Die bisherigen Untersuchungen unterstützen die These, dass IIV Echsen tatsächlich infizieren können und unter bestimmten Umständen krank machen. Außerdem gibt es Hinweise auf eine mögliche vertikale Übertragung von IIV bei Bartagamen. Weitere Untersuchungen in dieser Richtung könnten hierzu endlich Beweise liefern.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zweck dieser Arbeit war es herauszufinden, ob Grillen (*Gryllus bimaculatus*) und Bartagamen (*Pogona vitticeps*) mit einem Invertebraten-Iridovirus-ähnlichen Isolat aus einem toten Helmchamäleon (*Chamaeleo hoehnelii*) infiziert werden können und ob eine Infektion für diese Tiere pathogen ist. In den letzten Jahren wurden Invertebraten-Iridoviren (IIV) vermehrt aus Futtertierzuchten und Echsen isoliert. Da es sich bei diesen isolierten Iridoviren um Viren des Genus *Iridovirus* handelt, die bis vor kurzem nur bei Invertebraten beschrieben wurden, ist deren Vorkommen bei Vertebraten besonders bemerkenswert. Eine orale Infektion der Echsen über infizierte Futtertiere wurde angenommen. Für die Diagnose von IIV-Infektionen standen zu Beginn verschiedene Zellkulturen (TH-1 und VH2), eine PCR nach JUST und ESSBAUER (2001), histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Verfügung. Im Laufe der Arbeit wurde die PCR durch eine neu entwickelte nested PCR mit Primern für das major capsid protein (MCP)-Gen (JAKOB et al., 2002) ersetzt und zusätzlich eine In-situ-Hybridisierung (ISH) entwickelt.

Um das pathogene Potential der IIV aus Echsen ermitteln zu können, wurden zunächst drei Infektionsversuche mit Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* durchgeführt. Die Grillen wurden mit dem Iridovirusisolat 100/01 aus dem toten Helmchamäleon durch Dippen in eine Virussuspension (Virusgehalt $10^{6,25}$ bis $10^{7,25}$ KID₅₀/ml) infiziert. Pro Infektionsversuch wurden 20 Tiere infiziert und 10 dienten als Kontrollen. Den im Laufe des Versuches gestorbenen Grillen und den nach Ende des Versuches getöteten Grillen wurden Fettkörperproben entnommen und untersucht. Im Anschluss an die Infektionsversuche mit Grillen wurde Bartagamen der Spezies *Pogona vitticeps* oral infizierte Grillen und eine Virussuspension ($10^{6,75}$ KID₅₀/ml) per Sonde verabreicht. Sechs von zehn Bartagamen wurden infiziert und vier Bartagamen dienten als Kontrollen. Alle zwei Wochen nach Versuchsbeginn wurde ein infiziertes Tier und alle vier Wochen ein Kontrolltier euthanasiert.

Allen Bartagamen wurden wöchentlich Rachen- und Kloakentupfer und bei der Sektion Proben von 13 Organen entnommen und untersucht.

Die Grillen konnten erfolgreich mit dem Isolat 100/01 infiziert werden. Es kam zu patenten Infektionen, die mit Mortalität und Irideszenz einhergingen, aber auch zu klinisch inapparenten Infektionen. Die Mortalität der infizierten Grillen lag bei 20 bis 40 %. Eine Virusinfektion konnte mit den angewandten Untersuchungsmethoden in den drei Infektionsversuchen in einer unterschiedlichen Anzahl von Grillen nachgewiesen werden (15 von 20 Grillen (75 %), 3 von 20 Grillen (15 %) und 6 von 20 Grillen (30 %)). Die nested PCR war mit insgesamt 24 positiven von 60 infizierten Grillen (40 %) die sensitivste Methode, um IIV in den Fettkörperproben der infizierten Grillen nachzuweisen.

Einige der infizierten Bartagamen zeigten im Laufe des Versuches zeitweise ein reduziertes Allgemeinbefinden, aber bis zum Ende des Versuches (12 Wochen) starb kein Tier. Bei den Sektionen konnten keine mit einer Virusinfektion in Zusammenhang stehenden pathologischen Veränderungen gefunden werden. Die Virusisolierung mittels Zellkulturen war nur aus Tupferproben der infizierten Bartagamen bis 2 Wochen nach der Infektion erfolgreich. In der nested PCR waren verschiedene Organe von fünf infizierten Bartagamen, aber auch von drei Kontrolltieren positiv. Die histologischen und elektronenmikroskopischen Untersuchungen und die ISH-Untersuchungen waren negativ. Daher wurden zwei im selben Raum und unter den gleichen Bedingungen wie die Kontrolltiere gehaltene Reservebartagamen, von anderen Elterntieren, mit der nested PCR getestet. Sie waren negativ. Um die Ursache für die positiven nested PCR-Ergebnisse der Kontrollbartagamen zu klären, wurden weitere Tupferproben der Elterntiere der Versuchstiere untersucht. Dabei war einmalig ein Rachen- und Kloakentupfer des Vatertieres in der nested PCR positiv. Zusätzlich konnten bei einem weiteren Gelege dieser Elterntiere Amplikons der gesuchten Größe aus den Schalen von drei Eiern in der nested PCR

amplifiziert werden. Die Sequenzierung dieser Amplikons ergab eine zu 100 % mit 100/01 identische Nukleinsäuresequenz. Daher konnte eine Infektion der Bartagamen durch ihren Vater vor Versuchsbeginn nicht ausgeschlossen werden.

7 SUMMARY

Infection of crickets (*Gryllus bimaculatus*) with an iridovirus isolated from a high-casqued chameleon (*Chamaeleo hoehneli*) and initial study on the transmission of an iridovirus to bearded dragons (*Pogona vitticeps*) using iridovirus-infected crickets

The purpose of this study was to find out whether crickets (*Gryllus bimaculatus*) and bearded dragons (*Pogona vitticeps*) can be infected with an invertebrate-iridovirus-like isolate from a dead high-casqued chameleon (*Chamaeleo hoehneli*). During the last few years these viruses have been increasingly isolated from commercial insect colonies and lizards. The isolated iridoviruses belong to the genus *iridovirus*. Until recently, these iridoviruses had only been described in invertebrates. Their appearance in lizards is therefore remarkable. An oral infection of the lizards via infected food animals was hypothesized. Before this study, various cell cultures (TH-1 and VH2), a PCR according to JUST und ESSBAUER (2001), histological and electron microscopic investigations were the tools available for the diagnosis of invertebrate iridovirus (IIV) infections. During the course of this study, the PCR was replaced by a newly developed nested PCR with primers for the major capsid protein gen (JAKOB et al., 2002) and an in situ hybridisation (ISH) was developed.

To determine the pathogenic potential of IIVs from lizards three infection studies with crickets of the species *Gryllus bimaculatus* were carried out. The crickets were infected with the isolate from the dead high-casqued chameleon by dipping into virus suspension (virus titer $10^{6,25}$ to $10^{7,25}$ TCID₅₀/ml). In each infection study 20 animals were infected and 10 were used as control animals. Fat body samples were taken from the crickets that died during the trial and the ones that were euthanized at the end. Following the cricket studies infected crickets and virus suspension were orally administered to bearded dragons of the species *Pogona vitticeps*. Six of ten animals were infected and four served as controls. One control animal was

euthanized before the infected group was infected. Every two weeks after infection an infected animal was euthanized and every four weeks a control animal was euthanized as well. Every week oral and cloacal swabs were collected from all bearded dragons. During necropsy, samples from 13 organs were collected and examined.

The crickets were successfully infected with patent infections, including mortality and iridescence as well as inapparent infections. The mortality rates in the infected crickets ranged between 20 and 40 %. Virus detection methods in the three trials were positive in varying numbers of crickets (15 of 20 (75 %), 3 of 20 (15 %) and 6 of 20 (30 %)). The nested PCR was the most sensitive tool for detecting IIV in the fat body samples with a total of 24 positive of 60 infected crickets (40 %).

Some of the infected bearded dragons showed a temporary reduction in general condition during the 12 weeks long trial, but none of the ten animals died. No pathological changes that could be attributed to a viral infection were detected at necropsies. Virus isolation on cell culture was only successful from swabs of infected animals up to two weeks after infection. In the nested PCR, varying organs from five infected animals, as well as from three control animals were positive. The histological and electron microscopic and ISH examinations were negative. After virus was detected in the negative controls, tissues from two reserve animals from other parents that were kept in the same room and under the same conditions as the control animals were tested with the nested PCR. They were negative. To find out the source of the IIV detected by nested PCR in the control bearded dragons additional swabs were collected from the parents of the animals in the transmission study. An oral and a cloacal swab from the father were positive in the nested PCR. Additionally amplicons of the expected size were amplified from three eggs of a new clutch from the same parents in the nested PCR. Sequencing of these amplicons showed 100 % identity to the corresponding sequence from isolate 100/01. It is therefore possible that the

bearded dragons were infected by their father before the beginning of the transmission study.

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.
- AHNE, W., SCHLOTFELDT, H. J. und THOMSEN, I. (1989):
Fish viruses: isolation of an icosahedral cytoplasmic deoxyribovirus from sheatfish (*Silurus glanis*).
Zentralbibliothek Veterinärmedizin B **36**, 333-336.
- 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 lacertids with lizard erythrocytic viruses.
Intervirolgy **45**, 150-159.
- AVTALION, R. R., WEISS, E. und MOELEM, T. (1976):
Regulatory effects of temperature upon immunity in ectothermic vertebrates.
In: Comparative Immunology. Marchalonis, J.J. (ed.). Blackwell, Oxford, S.227-238.
- BARTHOLOMEW, G. A. und TUCKER, V. A. (1963):
Control of changes in body temperature, metabolism, and circulation by the agamid lizard, *Amphibolurus barbatus*.
Physiological Zoology **36**, 199-218.
- BASTO, A. P., NIX, R. J., BOINAS, F., MENDES, S., SILVA, M. J., CARTAXEIRO, C., PORTUGAL, R. S., LEITAO, A., DIXON, L. K. und MARTINS, C. (2006)
Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks.
Journal of General Virology **87**, 1863-1871.
- BELLET, A. J. D. (1968):
The iridescent virus group.
Advances in Virus Research **13**, 225-241.

- 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.
- BOLLINGER, T. K., MAO, J., SCHOCK, D., BRIGHAM, R. M. und CHINCHAR, V. G. (1999):
Pathology, isolation, and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan.
Journal of Wildlife Diseases **35**, 413-429.
- CALIS, H. und ZWART, P. (1998):
A mixed viral and bacterial infection in a colony of crickets (*Gryllus assimilis* and *Acheta domesticus*). A case report.
Proceedings of the combined meeting of the 2nd Scientific Meeting of the European Association of Zoo- and Wildlife Veterinarians (EAZWV) and the British Veterinary Zoological Society (BVZS), Chester, United Kingdom, 21.-24.05.1998, S. 251-254.
- CHEN, Z.-X., ZHENG, J.-C. und JIANG, Y.-L. (1999):
A new iridovirus isolated from soft-shelled turtle.
Virus Research **63**, 147-151.
- CHINCHAR, V. G. (2002):
Ranaviruses (family *Iridoviridae*): emerging cold-blooded killers.
Archives of Virology **147**, 447-470.
- CHINCHAR, V. G., ESSBAUER, S., HE, J. G., HYATT, A., MIYAZAKI, T., SELIGY, V. und WILLIAMS, T. (2005):
Iridoviridae.
In: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. und Ball, L.A. (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam, S. 145-162.
- CONSTANTINO, M., CHRISTIAN, P., MARINA, C. F. und WILLIAMS, T. (2001):
A comparison of techniques for detecting Invertebrate iridescent virus 6.
Journal of Virological Methods **98**, 109-118.
- COOPER, E. L., KLEMPAU, A. E. und ZAPATA, A. G. (1985):
Reptilian immunity.
In: *Biology of the Reptilia. Volume 14*. Gans, C., Bilett, F., Maderson, P.F.A. (eds.). John Wiley and sons, New York, N.Y., S. 599-678.

- CORDIER, O., TONDRE, L., AUBERTIN, A. M. und KIRN, A. (1986):
Restriction of frog virus 3 polypeptide synthesis to immediate early and delayed early species by supraoptimal temperatures.
Virology **152**, 355-364.
- CULLEN, B. R. und OWENS, L. (2002):
Experimental challenge and clinical cases of Bohle iridovirus (BIV) in native Australian anurans.
Diseases of Aquatic Organisms **49**, 83-92.
- CUNNINGHAM, A. A., LANGTON, T. E., BENNETT, P. M., LEWIN, J. F., DRURY, S. E., 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. Series B **351**, 1539-1557.
- 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.
- DE VOSJOLI, P., MAILLOUX, R., DONOGHUE, S., KLINGENBERG, R. und COLE, J. (2001):
The importance of heating and lighting.
In: *The bearded dragon manual*. Fox, A. (ed.). Advanced Vivarium Systems, Inc., Irvine, California, USA, S. 32-42.
- DIXON, L. K., ESCRIBANO, J. M., MARTINS, C., ROCK, D. L., SALAS, M. L. und WILKINSON, P. J. (2005):
Asfarviridae.
In: *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. und Ball, L.A. (eds.). Elsevier Academic Press, Amsterdam, S. 135-143.

- DOCHERTY, D. E., METEYER, C. U., WANG, J., MAO, J., CASE, S. T. und CHINCHAR, V. G. (2003):
Diagnostic and molecular evaluation of three iridovirus-associated salamander mortality events.
Journal of Wildlife Diseases **39**, 556-566.
- DRURY, S. E. N., GOUGH, R. E. und CALVERT, I. (2002):
Detection and isolation of an iridovirus from chameleons (*Chamaeleo quadricornis* and *Chamaeleo hoehnelli*) in the United Kingdom.
Veterinary Record **150**, 451-452.
- EMANUEL, J. R. (1991):
Simple and efficient system for synthesis of non-radioactive nucleic acid hybridization probes using PCR.
Nucleic Acids Research **19**, 2790-2790.
- ESSBAUER, S. und AHNE, W. (2001):
Viruses of lower vertebrates.
Journal of Veterinary Medicine B **48**, 403-475.
- EVANS, E. E. und COWLES, R. B. (1959):
Effect of temperature on antibody synthesis in the reptile *Dipsosaurus dorsalis*.
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) **101**, 482-482.
- FRASER, W. A., KEEFE, T. J. und BOLON, B. (1993):
Isolation of an iridovirus from farm-raised gouramis (*Trichogaster trichopterus*) with fatal disease.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigations **5**, 250-253.
- FRIEDERICH, U. und VOLLAND, W. (1998):
Futtertierzucht. Lebendfutter für Vivarientiere.
Auflage 3. Eugen Ulmer GmbH & Co., Stuttgart, S. 81-94.
- GOORHA, R., GRANOFF, A., WILLIS, D. B. und MURTI, K. G. (1984):
The role of DNA methylation in virus replication: inhibition of frog virus 3 replication by 5-azacytidine.
Virology **138**, 94-102.
- GOORHA, R. und MURTI, K. G. (1982):
The genome of frog virus 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **79**, 248-252.

- GRANOFF, A., CAME, P. E. und RAFFERTY, K. A., JR. (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.
- GRAVELL, M. und GRANOFF, A. (1970):
Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. IX. The influence of temperature and host cell on replication of frog polyhedral cytoplasmic deoxyribovirus (PCDV).
Virology **41**, 596-602.
- 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.
- GRUIA-GRAY, J. und DESSER, S. S. (1992):
Cytopathological observations and epizootiology of frog erythrocytic virus in bullfrogs (*Rana catesbeiana*).
Journal of Wildlife Diseases **28**, 34-41.
- GRUIA-GRAY, J., PETRIC, M. und DESSER, S. (1989):
Ultrastructural, biochemical and biophysical properties of an erythrocytic virus of frogs from Ontario, Canada.
Journal of Wildlife Diseases **25**, 497-506.
- HALL, D. W. (1985):
Pathobiology of invertebrate icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses (*Iridoviridae*).
In: *Viral insecticides for biological control*. Maramorosch, K. und Sherman, K.E. (eds.). Academic Press, Inc., S.163-196.
- HALL, T. A. (1999):
BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.
Nucleic Acids Symposium Series **41**, 95-98.
- 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.

- HENDERSON, C. W., JOHNSON, C. L., LODHI, S. A. und BILIMORIA, S. L. (2001):
Replication of Chilo iridescent virus in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*, and development of an infectivity assay.
Archives of Virology **146**, 767-775.
- HERNANDEZ, O., MALDONADO, G. und WILLIAMS, T. (2000):
An epizootic of patent iridescent virus disease in multiple species of blackflies in Chiapas, Mexico.
Medical and Veterinary Entomology **14**, 458-462.
- HIERHOLZER, J. C. und KILLINGTON, R. A. (1996):
Virus isolation and quantitation.
In: *Virology Methods Manual*. Mahy, B.W.J. und Kangro, H.O. (eds.).
Academic Press, Harcourt Brace and Company, London, S. 25-46.
- HYATT, A. D., GOULD, A. R., ZUPANOVIC, Z., CUNNINGHAM, A. A., HENGSTBERGER, S., WHITTINGTON, R. J., KATTENBELT, J. und COUPAR, B. E. (2000):
Comparative studies of piscine and amphibian iridoviruses.
Archives of Virology **145**, 301-331.
- HYATT, A. D., WILLIAMSON, M., COUPAR, B. E., 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.
- JAKOB, N. J., KLEESPIES, R. G., TIDONA, C. A., MÜLLER, K., GELDERBLOM, H. R. und DARAI, G. (2002):
Comparative analysis of the genome and host range characteristics of two insect iridoviruses: Chilo iridescent virus and a cricket iridovirus isolate.
Journal of General Virology **83**, 463-470.
- JAKOB, N. J., MÜLLER, K., BAHR, U. und DARAI, G. (2001):
Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of Chilo iridescent virus.
Virology **286**, 182-196.
- JOHNSRUDE, J. D., RASKIN, R. E., HOGE, A. Y. und ERDOS, G. W. (1997):
Intraerythrocytic inclusions associated with iridoviral infection in a fer de lance (*Bothrops moojeni*) snake.
Veterinary Pathology **34**, 235-238.

- 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.
- JUST, F. T. und ESSBAUER, S. S. (2001):
Characterization of an iridescent virus isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: *Gryllidae*).
Journal of Invertebrate Pathology **77**, 51-61.
- KLEESPIES, R. G., TIDONA, C. A. und DARAI, G. (1999):
Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range.
Journal of Invertebrate Pathology **73**, 84-90.
- KÖHLER, G. (1997):
Inkubation von Reptilieneiern.
Herpeton, Verlag Elke Köhler, Offenbach, S. 150-150.
- KÖHLER, G., GRIEBHAMMER, K. und SCHUSTER, N. (2003a):
Einführung.
In: Bartagamen. Biologie Pflege Zucht Erkrankungen. Herpeton, Verlag Elke Köhler, Offenbach, S. 8-27.
- KÖHLER, G., GRIEBHAMMER, K. und SCHUSTER, N. (2003b):
Pflege im Terrarium.
In: Bartagamen. Biologie Pflege Zucht Erkrankungen. Herpeton, Verlag Elke Köhler, Offenbach, S. 72-83.
- LANGDON, J. S. und HUMPHREY, J. D. (1987):
Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia.
Journal of Fish Diseases **10**, 289-297.
- LANGDON, J. S., HUMPHREY, J. D. und WILLIAMS, L. M. (1986):
First virus isolation from australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L.
Journal of Fish Diseases **9**, 263-268.
- LINKEY und NIELSEN (1968):
Transmission of a mosquito iridescent virus in *Aedes taeniorhynchus*.
Journal of Invertebrate Pathology **12**, 7-24.

- LORBACHER DE RUIZ, H., GELDERBLOM, H., HOFMANN, W. und DARAI, G. (1986):
Insect iridescent virus type 6 induced toxic degenerative hepatitis in mice.
Medical Microbiology and Immunology **175**, 43-53.
- 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.
- MARSCHANG, R. E., BECHER, P. und BRAUN, S. (2002):
Isolation of iridoviruses from three different lizard species.
Proceedings Association of Reptile and Amphibian Veterinarians, Reno, NV, USA, 09.10.-13.10.2002.
- 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.
- MONINI, M. und RUGGERI, F. M. (2002):
Antigenic peptides of the epizootic hematopoietic necrosis virus.
Virology **297**, 8-18.
- 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 30. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Sofia, 1988, S. 271-274.
- SCHNITZLER, P. und DARAI, G. (1993):
Identification of the gene encoding the major capsid protein of fish lymphocystis disease virus.
Journal of General Virology **74**, 2143-2150.
- SCHUH, J. C. L. und SHIRLEY, I. G. (1990):
Viral hematopoietic necrosis in an angelfish (*Pterophyllum scalare*).
Journal of Zoo and Wildlife Medicine **21**, 95-98.

- SMITH, T. G., DESSER, S. S. und HONG, H. (1994):
Morphology, ultrastructure and taxonomic status of *Toddia* sp. in northern water snakes (*Nerodia sipedon sipedon*) from Ontario, Canada.
Journal of Wildlife Diseases **30**, 169-175.
- SPEARE, R., FREELAND, W. J. und BOLTON, S. J. (1991):
A possible iridovirus in erythrocytes of *Bufo marinus* in Costa Rica.
Journal of Wildlife Diseases **27**, 457-462.
- STADEN, R. (1996):
The Staden Sequence Analysis Package.
Molecular Biotechnology **5**, 233-241.
- STEBBENS, W. E. und JOHNSTON, M. R. (1966):
The viral nature of *Pirhemocytion tarentolae*.
Journal of Ultrastructure Research **15**, 543-554.
- STOHWASSER, R., RAAB, K., SCHNITZLER, P., JANSSEN, W. und DARAI, G. (1993):
Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction.
Journal of General Virology **74**, 873-879.
- 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.
- VAUGHN, J. L., GOODWIN, R. H., TOMPKINS, G. J. und MCCAWLEY, P. (1977):
The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae).
In Vitro **13**, 213-217.
- WEBBY, R. und KALMAKOFF, J. (1998):
Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses.
Archives of Virology **143**, 1949-1966.

- WESTHOUSE, 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.
- WILLIAMS, T. (1996):
The iridoviruses.
Advances in Virus Research **46**, 345-412.
- WILLIAMS, T. und CORY, J. S. (1994):
Proposals for a new classification of iridescent viruses.
Journal of General Virology **75**, 1291-1301.
- WILLIS, D. B., GOORHA, R., MILES, M. und GRANOFF, A. (1977):
Macromolecular synthesis in cells infected by frog virus 3. VII.
Transcriptional and post-transcriptional regulation of virus gene expression.
Journal of Virology **24**, 326-342.
- WOLF, K., BULLOCK, G. L., DUNBAR, C. E. und QUIMBY, M. C. (1968):
Tadpole edema virus: A viscerotropic pathogen for anuran amphibians.
Journal of Infectious Diseases **118**, 253-262.

9 ANHANG

Tabelle 32: Ergebnisse der nested PCR des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*

	PV 01 KT	PV 04 KT		PV 07 KT	PV 10 KT	PV 02 IT		PV 03 IT	PV 05 IT	PV 06 IT	PV 08 IT	PV 09 IT
DÜ/O	DÜ	O 1	O 2	O	O	O 1	O 1	O	O	O	O	O
Gehirn	(+)	-	k.P.	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Zunge	-	-	k.P.	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Trachea	-	+	k.P.	+	-	+	+	+	-	-	-	-
Lunge	-	-	k.P.	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Herz	-	-	k.P.	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Magen	-	-	k.P.	-	-	+	+	-	-	-	+	-
Dünndarm	-	+	k.P.	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Dickdarm	-	-	k.P.	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Leber	-	-	k.P.	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Niere	-	-	k.P.	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Gonaden	-	-	k.P.	-	-	+	+	-	-	-	-	+
Fettkörper	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	k.P.	+
Haut	-	-	k.P.	-	-	+	+	+	+	-	+	+

grau hinterlegt = Sequenzierung: PCR Produkt sequenziert und die erhaltene Sequenz war zu 100 % mit der entsprechenden Sequenz des Isolates 100/01 identisch; DÜ = DNA-Präparation des Organüberstandes (Organ in Zellkulturmedium, ultraschallbehandelt und zentrifugiert); O = DNA-Präparation von Organmaterial; 1 = Probe 1, Proben der ersten Untersuchung; 2 = Probe 2; eine Probe zur Verifizierung der Ergebnisse wiederholt; (+) = sehr schwache Bande der gesuchten Größe; k.P. = keine Probe

Tabelle 33: Ergebnisse der Elektronenmikroskopie und der In-situ-Hybridisierung Infektionsversuch mit *Pogona vitticeps*

	PV 02 IT	PV 03 IT	PV 05 IT	PV 02 IT	PV 03 IT	PV 04 KT
	EM	EM	EM	ISH	ISH	ISH
Gehirn	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Zunge	?	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.
Trachea	-	-	n.u.	n.u.	-	-
Lunge	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Herz	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Magen	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.
Dünndarm	?	n.u.	n.u.	-	-	-
Dickdarm	-	-	-	n.u.	-	n.u.
Leber	-	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.
Niere	-	n.u.	-	n.u.	n.u.	n.u.
Gonaden	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.
Fettkörper	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.	-
Haut	-	n.u.	n.u.	-	-	n.u.

grau hinterlegt = in nested PCR positiv; n.u. = nicht untersucht; ? = nicht eindeutig identifizierbare Viruspartikel im EM; k.P. = keine Probe

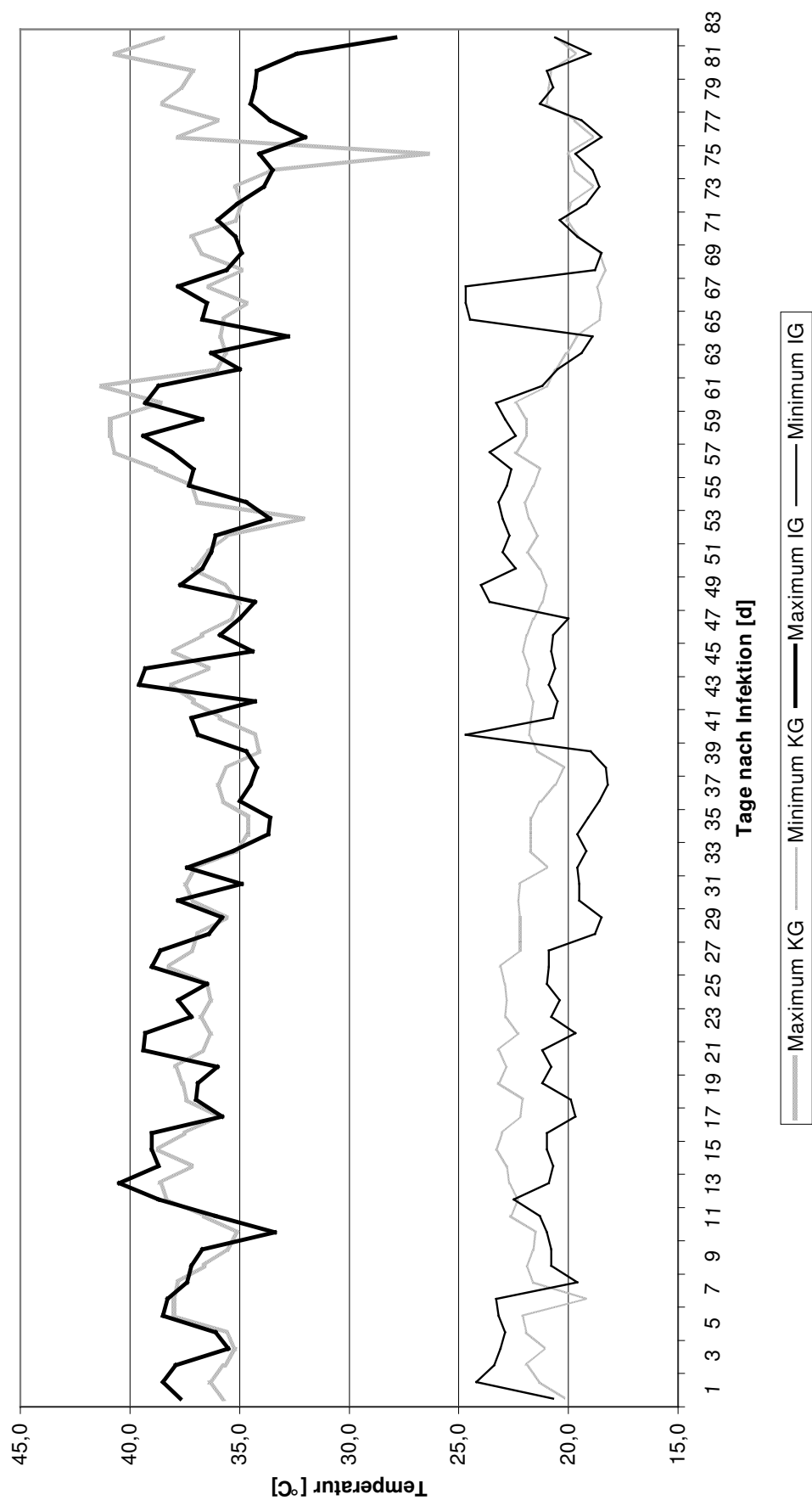


Abbildung 23: Temperaturverlauf des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*

Tabelle 35: Ergebnisse der nested PCR der Tupferproben von den infizierten Tieren des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*; Infektionsbeginn 03.03.2005

Tier	Todesstag	Tupfernummer und Datum der Tupferentnahme 2005												
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
PV 02 IT	17.03.05	Ra	-	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	13.04.	20.04	27.04.	04.05.	11.05.	18.05.	25.05.
		Klo	+	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 03 IT	31.03.05	Ra	-	n.u.	+	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
		Klo	+	n.u.	? z	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 05 IT	14.04.05	Ra	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
		Klo	+	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 06 IT	28.04.05	Ra	-	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
		Klo	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	+	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 08 IT	12.05.05	Ra	+	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	-	n.u.	k.P.	k.P.
		Klo	+	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	-	n.u.	k.P.	k.P.
PV 09 IT	25.05.05	Ra	-	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	-	n.u.	-	n.u.	-	+
		Klo	+	n.u.	+	n.u.	+	n.u.	-	n.u.	-	n.u.	-	+

Ra = Rachtentupfer; Klo = Kloakentupfer; k.P. = keine Probe; n.u. = nicht untersucht; z = zu wenig: DNA-Präparation wurde mit weniger als 200 µl Probenmaterial durchgeführt; ? = sehr schwache Bande der gesuchten Größe sichtbar

Tabelle 36: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf TH-1 von den Negativkontrollieren des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*; Infektionsbeginn 03.03.2005

Tier	Todesstag	Tupfernummer und Datum der Tupferentnahme 2005																
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII				
PV 01 KT	03.03.05	Ra	-	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	
		Klo	-	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 04 KT	31.03.05	Ra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Klo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PV 07 KT	28.04.05	Ra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Klo	KGf -	-	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -	KGf -
PV 10 KT	25.05.05	Ra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Klo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

grau hinterlegt = in nested PCR positiv; Nur jede zweite Tupferentnahme wurde mit der nested PCR untersucht; Ra = Rachtentupfer; Klo = Kloakentupfer; k.P. = keine Probe; n.u. = nicht untersucht; KG = Keimgehalt, deshalb nicht weiter untersucht; KGf = aufgrund Keimgehalt mit 0,45 µm Filter gefiltert

Tabelle 37: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf TH-1 von den infizierten Tieren des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*; Infektionsbeginn 03.03.2005

Tier	Todesstag	Tupfernummer und Datum der Tupferentnahme 2005												
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
PV 02 IT	17.03.05	Ra	+	-	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
		Klo	-	+	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 03 IT	31.03.05	Ra	+	-	-	-	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
		Klo	KGF -	KGF -	KGF -	KGF -	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 05 IT	14.04.05	Ra	+	-	-	-	n.u.	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
		Klo	-	-	-	KGF -	-	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 06 IT	28.04.05	Ra	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
		Klo	-	-	-	KGF -	KGF -	KG	KG	n.u.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.
PV 08 IT	12.05.05	Ra	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.	k.P.	k.P.
		Klo	-	-	-	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	KG	n.u.	k.P.	k.P.
PV 09 IT	25.05.05	Ra	+	+	-	-	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	-	n.u.	n.u.	-
		Klo	-	KGF -	-	KGF -	-	KG	n.u.	n.u.	KG	n.u.	n.u.	KG

grau hinterlegt = in der nested PCR positiv; Ra = Rachentupfer; Klo = Kloakentupfer; k.P. = keine Probe; n.u. = nicht untersucht; KG = Keimgehalt; KGF = aufgrund Keimgehalt mit 0,45 µm Filter gefiltert

Tabelle 38: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf VH2 von den Negativkontrollieren des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*; Infektionsbeginn 03.03.2005

Tier	Todestag	Tupfernummer und Datum der Tupferentnahme 2005																			
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII							
PV 01 KT	03.03.05	Ra	-	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.			
		Klo	-	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.	k.P.		
PV 04 KT	31.03.05	Ra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Klo	KGf-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PV 07 KT	28.04.05	Ra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Klo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PV 10 KT	25.05.05	Ra	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Klo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

grau hinterlegt = in nested PCR positiv; Nur jede zweite Tupferentnahme wurde mit der nested PCR untersucht; Ra = Rachtentupfer; Klo = Kloakentupfer; k.P. = keine Probe; n.u. = nicht untersucht; KG = Keimgehalt; KGf = aufgrund Keimgehalt mit 0,45 µm Filter gefiltert

Tabelle 39: Ergebnisse der Virusisolierung der Tupferproben auf VH2 von den infizierten Tieren des Infektionsversuches mit *Pogona vitticeps*; Infektionsbeginn 03.03.2005

Tier	Todesstag	Tupfernummer und Datum der Tupferentnahme 2005												
		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13
		16.02.	09.03.	16.03.	23.03.	30.03.	06.04.	13.04.	20.04	27.04.	04.05.	11.05.	18.05.	25.05.
PV 02 IT	17.03.05	Ra Klo	+ KGF-	KG +	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.
PV 03 IT	31.03.05	Ra Klo	KGF- KGF-	- KG	- KGF-	- k.P.	- k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.
PV 05 IT	14.04.05	Ra Klo	KGF- -	- -	- KGF-	- -	- n.u.	n.u. n.u.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.
PV 06 IT	28.04.05	Ra Klo	- KGF-	- -	- KG	- KG	- KG	n.u. n.u.	n.u. n.u.	n.u. n.u.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.	k.P. k.P.
PV 08 IT	12.05.05	Ra Klo	+ +	- -	- -	- -	- -	n.u. n.u.	n.u. n.u.	n.u. n.u.	- KG	n.u. n.u.	k.P. k.P.	k.P. k.P.
PV 09 IT	25.05.05	Ra Klo	+ +	- -	- KGF-	- KG	- KG	n.u. n.u.	n.u. n.u.	n.u. n.u.	- KG	n.u. n.u.	n.u. n.u.	- KG

grau hinterlegt = in nested PCR positiv; Ra = Rachtentupferprobe; Klo = Kloakentupferprobe; k.P. = keine Probe; n.u. = nicht untersucht; KG = Keimgehalt; KGF = aufgrund Keimgehalt mit 0,45 µm Filter gefiltert

Tabelle 40: Ergebnisse der virologischen Untersuchungen der Tupferproben von den Elterntieren (II), der im Infektionsversuch eingesetzten *Pogona vitticeps*

				Mutter		Vater	
				Rachen	Kloake	Rachen	Kloake
Entnahme der Rachen- und Kloakentupferproben am	21.05.05	nach Eiablage	TH-1	-	-	-	-
			VH2	-	-	-	-
			PCR Ü	-	-	-	-
			PCR DÜ	-	-	+	+
	09.08.05		TH-1	-	KG	-	-
			VH2	-	-	-	-
			PCR Ü	-	-	-	-
			PCR DÜ	-	-	-	-
	13.11.05		TH-1	-	-	-	-
			VH2	-	-	-	-
			PCR Ü	-	-	-	-
			PCR DÜ	-	-	-	-
	29.03.06		TH-1	-	-	-	-
			VH2	-	-	-	-
			PCR Ü	-	-	-	-
			PCR DÜ	-	-	-	-
	09.05.06	nach Eiablage	TH-1	-	-	-	-
			VH2	-	-	-	-
			PCR Ü	-	-	-	-
			PCR DÜ	-	-	-	-

TH-1 = Virusisolierung auf TH-1; VH2 = Virusisolierung auf VH2; Ü = Organüberstand (Organ in Zellkulturmedium, ultraschallbehandelt und zentrifugiert, ohne DNA Präparation) als Template in die PCR Reaktion eingesetzt; DÜ = DNA-Präparation des Organüberstandes als Template in die PCR Reaktion eingesetzt; Rachen = Rachentupfer; Kloake = Kloakentupfer; KG = Keimgehalt

Tabelle 41: Statistische Berechnung der Wirksamkeit der Infektion (Infektionsversuche mit *Gryllus bimaculatus*) mit dem χ^2 -Test

		PCR		
		+	-	Summe
Infektion	Infizierte Tiere	24	36	60
	Kontrolltiere	0	30	30
		24	66	90
χ^2		16,36		
Wahrscheinlichkeit		99,9		

Alle Werte stehen für die Anzahl der betroffenen Tiere.

Tabelle 42: Statistischer Vergleich der drei Infektionsversuche mit *Gryllus bimaculatus* mit dem χ^2 -Test

Versuch	PCR		
	+	-	Summe
1	15	5	20
2	3	17	20
3	6	14	20
	24	36	60
χ^2	16,42		

Wahrscheinlichkeit 99,90 %

Alle Werte stehen für die Anzahl der betroffenen Tiere.

Die Versuche sind unabhängig, ein Unterschied ist hoch signifikant vorhanden.

Tabelle 43: Statistischer Vergleich der Abhängigkeit der Untersuchungsmethoden (Infektionsversuche mit *Gryllus bimaculatus*) mit dem χ^2 -Test

	VH2		PCR		Histologie		Elektronenmikroskopie		In-situ-Hybridisierung	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
TH-1	13	2	15	0	13	2	13	2	8	7
	2	73	9	66	1	34	1	12	1	21
	15	75	24	66	14	36	14	14	9	28
	63,50		49,50		36,58		17,37		11,53	
VH2	15	0	15	0	13	2	13	2	7	7
	9	66	9	66	1	34	1	12	2	21
	24	66	24	66	14	36	14	14	9	28
	49,50		49,50		36,58		17,37		8,07	
PCR	14	7	14	7	14	7	14	7	9	14
	0	29	0	29	0	29	0	6	0	14
	14	36	14	36	14	36	14	13	9	28
	26,85		26,85		26,85		8,31		7,24	
Histologie	14	0	14	0	14	0	14	0	8	6
	0	12	0	12	0	12	0	12	1	16
	14	12	14	12	14	12	14	12	9	22
	26,00		26,00		26,00		26,00		9,79	
Elektronenmikroskopie	8	6	8	6	8	6	8	6	8	6
	1	12	1	12	1	12	1	12	1	13
	9	18	9	18	9	18	9	18	9	18
	7,42		7,42		7,42		7,42		7,42	

Alle Werte stehen für die Anzahl der betroffenen Tiere.

Tabelle 44: Statistische Berechnung (Infektionsversuche mit *Gryllus bimaculatus*) nach dem McNemar Test

		TH-1			VH2		
		+	-	Summe	+	-	Summe
PCR	+	15	9	24	15	9	24
	-	0	66	66	0	66	66
		15	75	90	15	75	90
		7,11			7,11		
		0,008 sign.			0,008 sign.		

Alle Werte stehen für die Anzahl der betroffenen Tiere.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig 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.“

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. R. Böhm und Prof. Dr. E. F. Kaleta für die nette Betreuung und für entscheidende Verbesserungen an der Struktur der Arbeit bedanken. Dr. med. vet. Rachel E. Marschang danke ich, dass Ihre Wahl bei der Suche nach einem Doktoranten auf mich fiel und ich so die Möglichkeit hatte an einer Doktorarbeit zu arbeiten, die mir auch als praktische Tierärztin nutzen wird.

Besonders bedanken möchte ich mich bei DVM, MSc Tibor Papp für die intensive Zusammenarbeit und seine große Hilfe bei den Sequenzierungen. Meinen ehemaligen Laborkollegen Anneke, Anthony, Lorenza und Tibor danke ich für ihr freundliches und hilfsbereites Wesen, das jeden Arbeitstag bereichert hat. Bedanken möchte ich mich auch bei den virologischen Technischen Assistentinnen Silvia und Christa für ihre Hilfe und ihre guten Nerven. Dr. Ulrike Hahn und Dr. med. vet. Wolfgang Beyer haben mich mit vielen fruchtbaren Diskussionen und fachkundigen Kommentaren unterstützt. Nicht zu vergessen die Unterstützung vieler anderer Kollegen des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene, die sowohl fachlich als auch privat immer ein gutes Wort für mich hatten. Dietmar Marschang danke ich für seine großartige Hilfe bei der Erschaffung sämtlicher Tierunterbringungen und deren elektrischer Versorgung zu quasi jeder Tages- und Nachtzeit.

Frau Dr. Regina Kleespies, Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft Darmstadt BBA, und ihrer TA danke ich für die geduldige Einführung in die Grillenzucht und die ersten Grillen. Thomas Röser danke ich für die Eier der Bartagamen und, dass ich immer wieder zur Tupferprobenentnahme vorbeikommen durfte. Prof. Dr. rer. nat. Pfitzner, Dr. rer. nat. B. Roth und Arnold, Institut für Genetik, Fachgebiet Allgemeine Virologie, Universität Hohenheim stellten mir die ersten SF-21-Zellen zur Verfügung. Prof. Dr. med. vet. W. Amselgruber, Anatomie und Physiologie der Haustiere des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin

mit Tierklinik der Universität Hohenheim danke ich dafür, dass ich die Stallungen für die Bartagamen nutzen durfte und alle histologischen Proben in seinem Institut bearbeiten durfte. Dabei halfen mir vor allem Frau Müller und Frau Holzäpfel. Prof. Dr. med. vet. Jens P. Teifke und seiner TA Fr. Gabriele Czerwinski, Friedrich-Loeffler-Institut, Bundesforschungsinstitut für Tiergesundheit, Insel Riems danke ich für die intensive Unterstützung in Bezug auf die ISH. Professor Dr. A. P. Alves de Matos, Dental Medical School (ITB), Universität Lissabon, und Pathological Anatomy Department, Curry Cabral Hospital, Lissabon, Portugal möchte ich für seine zeitintensive Unterstützung bei allen elektronenmikroskopischen Arbeiten danken. Dies gilt natürlich auch für das Institut für Zoologie der Universität Hohenheim unter der Leitung von Prof. Dr. M. Blum in Person von Dipl.-Biol. Kerstin Muders und Sibylle Wolf.

Dieses Projekt wurde finanziert durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) ohne deren finanzielle Mittel eine Durchführung nicht möglich gewesen wäre.

Doch am meisten gilt mein Dank meinen Eltern Michael und Marianne Weinmann. Ohne meine Eltern wäre ein Studium gar nicht möglich gewesen. Nicht zuletzt danke ich Matthias Wellnitz für seine bedingungslose Liebe und die permanente moralische Unterstützung, die die Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich gemacht haben.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAU FENB ER GRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

ISBN 3-8359-5221-8



Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

9 783835 195221 8

