

**UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG
VON HERPESVIREN BEI LANDSCHILDKRÖTEN
DURCH RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN,
SERUMNEUTRALISATIONSTEST UND PCR**

CLAUDIA TORNEDE

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
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

Untersuchungen zur Differenzierung von Herpesviren bei Landschildkröten durch Restriktionsendonukleasen, Serumneutralisationstest und PCR

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

eingereicht von

CLAUDIA TORNEDE
Tierärztin aus Schlangen

Gießen 2006

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

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.F. Kaleta
2. Berichterstatter: PD Dr. P. Becher

Tag der mündlichen Prüfungen: 15.09.2006 und 22.09.2006

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Fragestellung der eigenen Untersuchung	2
2	Literaturübersicht	4
2.1	Herpesviren	4
2.1.1	Aufbau der Herpesviren	4
2.1.2	Nomenklatur und Klassifikation der Herpesviren	5
2.1.3	Klassifikation nach antigenen Eigenschaften.....	7
2.1.4	Genom und Genomaufbau	8
2.2	Herpesviren bei Landschildkröten.....	8
2.2.1	Klinische Symptome	9
2.2.2	Speziesverteilung	11
2.2.3	Pathologisch-anatomische und histologische Befunde.....	13
2.2.4	Differential-Diagnosen	15
2.2.5	Direkte Nachweisverfahren.....	15
2.2.6	Molekularbiologische Nachweis- und Differenzierungsverfahren.....	16
2.2.7	Biologische Charakterisierung	17
2.2.8	Serumneutralisationstests bei Landschildkröten.....	18
2.2.9	Einteilung von Schildkröten-Herpesviren nach Wirtsspektrum und Erstbeschreibung.....	19
2.3	Herpesviren bei Wasser- und Meeresschildkröten	19
2.3.1	Herpesviren bei Wasserschildkröten	20
2.3.2	Herpesviren bei Meeresschildkröten.....	20
2.4	Restriktionsendonukleasen.....	22
2.4.1	Auftrennung von Restriktionsfragmenten durch Elektrophorese im Agarosegel.....	24
2.4.2	Charakterisierung und Differenzierung von Herpesviren durch Restriktionsfragment-Längenpolimorphismus (RFLP)	24
2.5	Polymerase chain reaction (PCR).....	25
3	Material und Methoden	29
3.1	Material	29

3.1.1	Substanzen und Geräte für die Gewinnung, Isolierung und Charakterisierung der Virusisolate	29
3.1.2	Substanzen und Geräte für die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	30
3.1.3	Substanzen und Geräte für den Nachweis von DNA durch PCR.....	31
3.1.4	Weitere Materialien und Geräte	34
3.1.5	Untersuchte Proben	35
3.2	Methoden.....	39
3.2.1	Kultivierung und Subkultivierung von Zellkulturen	39
3.2.2	Anzüchtung, Passagierung und Portionierung der Isolate	40
3.2.3	Endpunkttitrationen	41
3.2.4	Neutralisationstest	41
3.2.5	Chloroform-Resistenztest	42
3.2.6	Virusvermehrung in Anwesenheit von 5-Iod-2-Desoxy-Uridin (IUDR)	43
3.2.7	Elektronenmikroskopische Untersuchungen	43
3.2.8	Extraktion, Reinigung und Anreicherung viraler DNA	44
3.2.9	DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen und Einteilung in Gruppen anhand des Spaltmusters	45
3.2.10	Polymerase chain reaction (PCR).....	47
3.2.11	Gelelektrophorese	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Vorbericht, klinische Befunde und Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen	52
4.2	Charakterisierung der Virusisolate	62
4.2.1	Chloroformbehandlung und Kultivierung mit IUDR	62
4.2.2	Elektronenmikroskopische Untersuchung.....	62
4.2.3	Veränderungen der Morphologie des infizierten Zellrasens (cytopathischer Effekt=cpE)	62
4.3	Restriktionsendonukleasenmuster	64
4.3.1	Ergebnisse der Vorversuche.....	64
4.3.2	Ergebnisse der DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen	64
4.4	Ergebnisse der Neutralisationstests.....	100

4.5	Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA mittels PCR.....	102
4.5.1	Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA aus infiziertem Zellkulturüberstand	102
4.5.2	Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA aus Organmaterial ...	110
4.5.3	Ergebnisse der Untersuchungen zur Spezifität der durchgeführten PCRs	115
5	Diskussion	118
5.1	Virusidentifikation und -differenzierung mit Restriktionsendonukleasen ..	119
5.2	Beziehung zwischen Restriktionsendonukleasen-Muster und Antikörper- Bildung.....	120
5.3	Auslösende Faktoren einer Herpesvirus-Erkrankung und Einfluss der Spezies auf eine Erkrankung und auf den Krankheitsverlauf.....	123
5.4	Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA mittels PCR.....	126
6	Zusammenfassung.....	132
7	Summary.....	135
8	Literatur.....	137

Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Agr.	Agrionemys
AK	Antikörper
Aqua bidest	Aqua bidestillata
Aqua dest	Aqua destillata
BfA	Bundesforschungsanstalt
BgVV	Bundesanstalt für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BHV	Bovines Herpesvirus
bp	Basenpaare
BW	Buffered Water
°C	Grad Celsius
ca.	circa
ChHV	Chelonid Herpesvirus
CO₂	Kohlendioxid
cpE	zytopathischer Effekt
Da	Darm
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EHV	Equines Herpesvirus
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELMI	Elektronenmikroskop
etc.	et cetera
G.	Geochelone
g	Gramm
Geh	Gehirn
GTFP	Green turtle fibropapillomatose
ICTV	International Committee for the Taxonomy of Viruses
IR	internal repeats
IUDR	5-Iodo-2'-Desoxyuridin
KehlK	Kehlkopf
KID₅₀	Kultur-infektiöse Dosis 50%
l	Liter
Le	Leber
LETD	Lung, Eye and Trachea Disease
Lu	Lunge
µl	Mikroliter
mA	Milliampere
mg	Milligramm

min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
MgCl₂	Magnesiumchlorid
Ni	Niere
nm	Nanometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
R	Rachentupfer
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
sec	Sekunde
SHV	Suid Herpesvirus
SVUA	Staatliches Veterinäruntersuchungsamt
T.	Testudo
Tab.	Tabelle
Trach	Trachea
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA
TH-1	<i>Terrapene</i> Heart-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U_L	unique long region
U	Umdrehung
U_s	unique short region
UV	Ultraviolett
V	Volt
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkultur
ZNS	Zentralnervensystem
z.T.	zum Teil
Zu	Zunge

1 Einleitung

Die Herpesvirusinfektion der Landschildkröte gilt als eine der wichtigsten viralen Infektionskrankheiten unter in Gefangenschaft gehaltenen Landschildkröten (MARSCHANG et al., 1997b; BLAHAK, 2000). Das liegt zum einen an dem schweren, oft tödlich endenden Krankheitsverlauf, zum anderen an der Fähigkeit der Herpesviren, in ein klinisch unauffälliges Stadium der Latenz überzugehen, aus dem sie reaktiviert werden können (KABISCH und FROST, 1994; MARSCHANG et al., 1997a; TEIFKE et al., 2000).

Latent infizierte Tiere, die durch Zukauf, Tausch bzw. als Fund- oder Pensionstiere in eine bereits bestehende Gruppe integriert wurden, haben das Virus inzwischen unter vielen Landschildkrötenarten in großen Teilen Europas, Nord-Amerikas und Japans verbreitet. Damit stellt die Infektion mit Herpesviren nicht nur eine Gefahr für Einzeltiere oder einzelne Bestände dar, sondern es ergeben sich Probleme für den gesamten Erhalt der Art (BIERMANN und BLAHAK, 1993).

Aus diesen Gründen ist die Erkrankung in das Interesse vieler Halter, Züchter, Händler und Tierärzte gerückt und ist weiterhin Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen, wobei ein besonderes Augenmerk der schnellen und sicheren Erkennung erkrankter oder latent infizierter Tiere gilt.

Gewöhnlich basiert die Diagnose einer akuten Herpesvirose auf dem direkten Nachweis des Virus, d.h. dem elektronenmikroskopischen Nachweis von Viruspartikeln, dem lichtmikroskopischen Nachweis von virusspezifischen Kern-Einschlußkörperchen oder der Vermehrung der Viren in Zellkulturen mit typischem zytopathischen Effekt (cpE). Auch molekularbiologische Methoden wie die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) kommen zunehmend zur Anwendung (UNE et al., 1999; ORIGGI et al., 2000; TEIFKE et al., 2000; MURAKAMI et al., 2001). Besonders aufgrund ihrer hohen Sensitivität und des schnell zu erhaltenden Ergebnisses scheint diese Methode den anderen Diagnoseverfahren überlegen.

Derzeit steht die PCR-Technik zur routinemäßigen Erkennung der Herpesvirose bei Landschildkröten noch in den Anfängen. Für einen zuverlässigen Herpesvirus-

Nachweis werden daher standardisierte und optimierte Durchführungsprotokolle benötigt.

Die Erkennung latent infizierter Tiere basiert hauptsächlich auf dem Nachweis von Serumantikörpern (KABISCH und FROST, 1994; BLAHAK, 2000; MARSCHANG et al, 2001a). Neben der Tatsache, dass serologische Tests in der Anfangsphase einer Erkrankung negativ ausfallen können und dass infizierte Tiere oft nicht mit der Bildung von Antikörpern reagieren, ist mit dem Vorhandensein mehrerer Serotypen zu rechnen, die bei der Wahl des Antigens zu berücksichtigen wären (BIERMANN, 1995; MARSCHANG, 1999; MARSCHANG, 2000; MARSCHANG et al., 2001a). Weiterhin sind noch viele Fragen offen, die das biologische Verhalten und den Genomaufbau betreffen. Eine weitergehende Klassifikation innerhalb der Familie der Herpesviren konnte daher noch nicht vorgenommen werden.

Die Untersuchung einer größeren Anzahl von Virusisolaten aus verschiedenen Ausbrüchen und von verschiedenen Landschildkrötenspezies auf Unterschiede in molekularbiologischer bzw. serologischer Hinsicht ist daher nötig, um diagnostische Untersuchungen sicherer zu gestalten und vorhandene Ergebnisse zu einzelnen Virusisolaten zu erweitern und zu bestätigen. Deshalb wurden auch zu Vergleichszwecken bereits näher differenzierte Virusisolate (BIERMANN, 1995; MARSCHANG et al., 1997a; MATHES, 2004) miteinbezogen.

1.1 Fragestellung der eigenen Untersuchung

In dieser Arbeit wurden 35 Herpesvirus-Isolate von sechs verschiedenen Landschildkrötenspezies untersucht.

Der Schwerpunkt der Untersuchung lag auf der möglichen Unterscheidbarkeit der Isolate sowohl auf molekularbiologischer und serologischer Ebene als auch in Hinsicht auf das biologische Verhalten, wie Schwere des Krankheitsbildes oder der Landschildkrötenspezies, die bevorzugt infiziert wurde.

Zunächst wurden die Isolate anhand ihres Restriktionsendonukleasen-Musters verglichen und differenziert.

Wenn möglich, wurden Daten über die näheren Umstände des Krankheitsverlaufs gesammelt. Diese Informationen sind z.T. lückenhaft, da alle Tiere von Privatbe-

sitzern stammten, die oftmals zu einer genaueren Befragung nicht zur Verfügung standen oder über keine genaueren Kenntnisse verfügten.

Weiterhin wurde untersucht, ob sich die Virusisolate auch serologisch in unterschiedliche Gruppen einteilen lassen und ob diese Einteilung übereinstimmt mit der Gruppeneinteilung durch Restriktionsendonukleasen-Analyse. Deshalb wurden eine Reihe von Landschildkrötenseren verschiedener Spezies auf Antikörper gegen drei Virusisolate getestet, die sich im Restriktionsmuster deutlich unterschieden hatten.

Darüber hinaus wurde überprüft, ob sich der Nachweis von Herpesvirus-DNA mittels empfindlicher molekularbiologischer Methoden (PCR) im Vergleich zu anderen Nachweisverfahren als sichere diagnostische Methode an Organ- und Rachentupferproben eignet. Ziel war es dabei, ein zuverlässiges PCR-Verfahren für den Routinenachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA zu entwickeln und auch hier mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Isolaten, bezüglich Sensitivität des PCR-Nachweises festzustellen oder auszuschließen.

2 Literaturübersicht

2.1 Herpesviren

Bereits im Altertum waren Hauterkrankungen mit Bläschenbildung, die wahrscheinlich von den Typen 1 und 2 des Herpes Simplex Virus ausgelöst wurden, bekannt.

Der Begriff Herpes leitet sich von „herpein“ (griechisch = kriechen) ab und weist sowohl auf die kriechende Ausbreitung des von Herpes Simplex Virus verursachten Hautausschlags, als auch auf die Fähigkeit des Virus hin, nach Erstinfektion, die mit Produktion infektiöser Nachkommenviren einhergeht, im Organismus in ein Latenzstadium überzugehen (MODROW et al., 2003). Die mögliche Reaktivierung führt zu einem gleichen oder ähnlichen Krankheitsbild.

Herpesvirusinfektionen kommen bei vielen Wirbeltierarten von Primaten bis hin zu Fischen und Fröschen vor. Sie gehören mit über 100 nachgewiesenen Spezies zu einer der zahlenmäßig größten Familien im System der Viren (ROLLE und MAYR, 2002).

Obwohl die Infektion sich in unterschiedlichen Organen manifestiert und die Symptome stark variieren, gleichen sich die unterschiedlichen Herpesviren in Partikelmorphologie und biologischen Eigenschaften.

2.1.1 Aufbau der Herpesviren

Herpesvirionen haben einen Durchmesser von 120-200 nm und bestehen aus mehr als 30 Strukturproteinen. Ein Virion besteht aus 4 Elementen (ROIZMAN, 1982):

- 1) Innenkörper (core)
- 2) Kapsid (capsid)
- 3) Tegument
- 4) Hülle (envelope)

Die lineare doppelsträngige DNA ist im Inneren des Partikels mit dem Virus-Core – einer fibrillären Proteinmatrix – assoziiert.

Das Capsid mit einem Durchmesser von ca. 100 nm ist mit 162 ikosaedrisch angeordneten Capsomeren besetzt, die einen polygonalen Querschnitt besitzen und tubuläre Strukturen an der oberflächenexponierten Seite bilden, die aber nicht in das Capsidinnere reichen.

Das Capsid ist von einer lipidhaltigen Hülle (envelope) umgeben, in die Glykoproteine und nichtglykosylierte Polypeptide eingelagert sind. Diese teilweise über die Oberfläche vorspringenden Proteine erfüllen Funktionen bei Absorption und Penetration der Partikel und bei der Induktion einer Antikörperbildung (ROLLE und MAYR, 2002).

Zwischen Hülle und Capsid befindet sich das Tegument, eine unstrukturierte Proteinmatrix, die bis zu 20 regulatorisch aktive Proteine enthält.

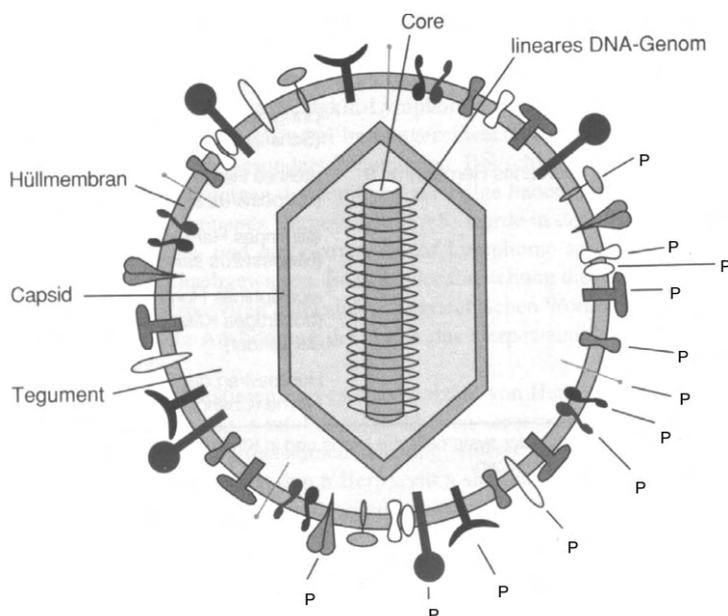


Abb. 1: Schematische Darstellung eines Herpes-simplex-Virus (entnommen aus MODROW et al., 2003, modifiziert, P = Protein)

2.1.2 Nomenklatur und Klassifikation der Herpesviren

Zunächst wurden Herpesviren nach den klinischen Symptomen, nach den Spezies, die erkrankten (z.B. Entenpestvirus) oder nach den Personen, die das Virus erstmalig isolierten (z.B. Epstein-Barr-Virus), benannt.

Nachdem die Zahl der neu isolierten Herpesviren sich ständig vergrößerte, wurden vom International Committee for the Taxonomy of Viruses (ICTV) folgende Empfehlungen für die Nomenklatur ausgesprochen (ROIZMAN et al., 1992):

Herpesviren werden nach der wissenschaftlichen Bezeichnung der Familien (bei Primaten und bei der Familie der Bovidae nach der Subfamilie) des natürlichen Primärwirtes benannt und die Endsilbe „id“ bzw. „ne“ angefügt.

Treten innerhalb der Familie bzw. Subfamilie mehrere Herpesviren auf, erhalten deren Namen in chronologischer Reihenfolge ihrer Erstisolierung eine arabische Ziffer (z.B. Equid Herpesvirus 8).

Die offizielle Verfahrensweise, die über die Klassifikation der Herpesviren bzw. Änderungen in diesem Bereich entscheidet, ist in einer Satzung des ICTV festgelegt. Vorschläge werden innerhalb des ICTV von einer Gruppe („Executive Committee“) innerhalb eines bestimmten Zeitraums diskutiert, bevor über eine Entscheidung von dem gesamten ICTV abgestimmt wird (MAYO et al., 2003).

Eine Einteilung in Subfamilie, Genus und Spezies erfolgt sowohl nach biologischen als auch nach molekularbiologischen Kriterien (ROIZMAN, 1982; ROIZMAN et al., 1992; MINSON et al., 2000).

Aufgrund ihrer Pathogenität, der infizierten Zelltypen, ihrer Vermehrungseigenschaften in vitro und Sequenzübereinstimmungen innerhalb bestimmter Genom-Regionen ist die Familie der Herpesviren in drei Subfamilien eingeteilt: Alpha-, Beta- und Gamma-Herpesvirinae (ROIZMAN, 1982, MINSON et al., 2000).

Alpha-Herpesviren breiten sich aufgrund ihres kurzen Replikationszyklus in vitro schnell mit cpE in der Zellkultur aus. Das Wirtsspektrum variiert von breit (Aujeszky Virus) bis sehr eng (Equines Rhinopneumonitis Virus). In vivo persistieren sie in den Nervenzellen der Ganglien.

Zu den Beta-Herpesviren gehören die sogenannten Zytomegalieviren der Säugetiere, deren infizierte Zellen histologisch deutlich vergrößert erscheinen. Durch ihren langen Vermehrungszyklus breiten sie sich nur langsam in der Zellkultur aus und ihr Wirtsspektrum ist meist auf eine Tierspezies beschränkt.

Gamma-Herpesviren besitzen eine Affinität zu B- und T-Lymphozyten und induzieren hier auch das Stadium der Latenz. Einige rufen lymphoproliferative Erkrankungen hervor. Nicht immer ist die Virusvermehrung in vitro mit einem cpE verbunden.

Vergleiche von DNA-Genomsequenzen haben zu der Vermutung geführt, dass sowohl die Herpesviren der Amphibien und Fische als auch ein Herpesvirus, welches aus Austern isoliert wurde (OsHV1), eigene Subfamilien bilden (DAVISON, 2002).

Weiterhin werden die Subfamilien aufgrund der Größe und Struktur ihres Genoms in bestimmte Genera und diese wiederum in unterschiedliche Spezies eingeteilt. Als unterschiedliche Spezies werden Herpesviren klassifiziert, deren DNA-Sequenz über weite Strecken des Genoms differiert und deren Mitglieder verschiedene ökologische Nischen besetzen, wie z.B. eine unterschiedliche Pathogenität oder unterschiedliche natürliche Wirte, die infiziert werden (MINSON et al., 2000).

Die zunehmende Fülle von Daten, die durch Sequenzierung des Genoms erhalten werden, erlaubt weiterhin die Einteilung von Herpesviren in bestimmte Abstammungslinien („distinct genetic lineages“). Zur Erstellung dieser Abstammungslinien werden sowohl die DNA- bzw. Aminosäure-Sequenzen hochkonservierter Herpesvirus-Gene miteinander verglichen als auch spezielle Gene identifiziert, die einzigartig innerhalb dieser Virusunterart sind (MINSON et al., 2000).

2.1.3 Klassifikation nach antigenen Eigenschaften

Werden innerhalb einer Virusspezies durch Serotypisierung mit polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern eigenständige Serotypen festgestellt, spricht man von Subspezies.

Treten innerhalb eines Serotyps kleinere antigene Differenzen auf, werden diese als Subtypen bezeichnet (ROLLE und MAYR, 2002).

Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass unter Schildkrötenherpesviren unterschiedliche Serotypen existieren.

BIERMANN (1995) fand nach Virus-Neutralisationstests zwei unterschiedliche Serogruppen. Auch MARSCHANG (2000) äußerte diese Vermutung, da sie bei ihren Untersuchungen ein Herpesvirus isoliert hatte, gegen das im Neutralisationstest kein Serum einen messbaren Antikörpertiter aufwies.

2.1.4 Genom und Genomaufbau

Das Genom der Herpesviren liegt in den Virionen als lineare doppelsträngige DNA vor, welche zwischen 120 und 230 kbp lang ist und ein Molekulargewicht von $80\text{--}150 \times 10^6$ Dalton besitzt (ROIZMAN, 1982; ROIZMAN et al., 1992).

Nach der Infektion wird die lineare DNA im Kernplasma in ein zirkuläres Episom überführt.

Die beiden DNA-Stränge kodieren für über 100, bei den Zytomegalieviren für über 200 Genprodukte. Deren Expression wird mit wenigen Ausnahmen von einem spezifischen Promotor kontrolliert (MODROW et al., 2003).

Zelluläre und virale Transaktivatoren der Promotoren bestimmen darüber, zu welchem Infektionszeitpunkt welches Gen exprimiert wird.

Alle Genome haben eine sogenannte unique long (U_L) und eine unique short (U_S) Region, die aus einmalig vorkommenden Sequenzabschnitten bestehen, welche durch sich wiederholende Sequenzabschnitte verbunden sind.

Diese Sequenzwiederholungen sind sowohl an den Genomenden (terminal repeats, TR) als auch innerhalb des Genoms (internal repeats, IR) vorhanden und können durch ihre Lage und Orientierung zueinander die Lage der einheitlichen Genomabschnitte variieren. So entstehen bis zu 4 isomere Formen des Genoms, welche mit unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten in den Virionen gefunden werden.

Aufgrund dieser Genomstrukturen können Herpesviren in 6 Gruppen eingeteilt werden (MODROW et al., 2003).

2.2 Herpesviren bei Landschildkröten

Die Herpesvirusinfektion verursacht in Europa die zur Zeit wichtigste virale Erkrankung der Landschildkröten (MARSCHANG et al., 1997b; BLAHAK, 2000; MARSCHANG, 2003).

Das Krankheitsbild ist unter dem Begriff *Mundfäule*, *Maulseuche*, *Herpesvirose* oder *Stomatitis-Rhinitis-Komplex* bekannt.

Eine Erstbeschreibung wurde von HOLT und COOPER (1976) veröffentlicht, welche hinter der Erkrankung noch bakterielle Ursachen vermuteten, aber schon da-

mals nicht ausschlossen, dass Bakterien nur eine Rolle als Sekundärerreger spielen.

Die seit der elektronenmikroskopischen Entdeckung von Herpesvirus-ähnlichen Partikeln durch HARPER et al. (1982) vermutete Virusätiologie wurde durch Übertragungsversuche bestätigt (ORIGGI et al., 2001a; ORIGGI et al., 2004): Zwei Virusisolate, die aus erkrankten *T. hermanni* stammten, wurden gesunden *T. graeca* verabreicht und riefen hier typische klinische und pathologisch-histologische Befunde hervor. Auch Herpesvirus-DNA konnte mittels PCR in einer Vielzahl von Organen nachgewiesen werden.

Es existieren eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die sich sowohl mit der Beschreibung des Krankheitsbildes, Prophylaxe und Therapie als auch mit Nachweisverfahren und molekularbiologischer Charakterisierung des Erregers beschäftigen.

2.2.1 Klinische Symptome

Herpesvirusinfektionen werden mit einer Vielzahl von Symptomen in Verbindung gebracht. Man unterscheidet akute, chronische und latente Verlaufsformen (MCARTHUR et al., 2002).

Die akute Erkrankung beginnt häufig mit serösem bis mukösem Nasen- und Augenausfluß (JACOBSON et al., 1985; BRAUNE et al., 1989; MARSCHANG et al., 1997a; MURO et al., 1998; KÜBER-HEISS et al., 1999; MARSCHANG, 2003; ORIGGI und RIGONI, 2003). Die Tiere werden lethargisch und nehmen kein Futter mehr auf (JACOBSON et al., 1985; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB and BESTETTI, 1989; OETTLE et al., 1990; KÜBER-HEISS et al., 1999; JOHNSON et al., 2003).

Als häufigstes Symptom finden sich respiratorische Symptome, wie Rhinitis, Stomatitis, Glossitis, und Pharyngitis, die mit diphtheroid-nekrotischen Belägen auf den Schleimhäuten und Atemnot einhergehen (JACOBSON et al., 1985; COOPER et al., 1988; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB and BESTETTI, 1989; MÜLLER et al., 1990; KABISCH and FROST, 1994; PETTAN-BREWER et al., 1996; MARSCHANG et al., 1997a; MURO et al., 1998; KÜBER-HEISS et al., 1999; DRURY

et al., 1999a/b; UNE et al., 1999; MARSCHANG et al., 2001; ORIGGI und RIGONI, 2003).

Einige Autoren berichten über subkutane Ödeme von Kopf, Hals und Unterkiefer (COOPER et al., 1988; MARSCHANG et al., 1997a; DRURY et al., 1999a/b) und zentralnervöse Bewegungsstörungen, z.B. die Unfähigkeit, Kopf und Gliedmaßen in den Panzer zurückzuziehen, Manegebewegungen, unnatürliche Kopfhaltung oder Parese der Hintergliedmaßen (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; OETTLE et al., 1990; WITTE, 1993; WENKER et al., 1997).

Teilweise werden abnorme Bewegungen, wie Streckung des Halses oder kreisende Kopfbewegungen, aber auch auf Luftnot infolge der die Atemwege verlegenden diphtheroiden Beläge zurückgeführt (BRAUNE et al., 1989; UNE et al., 1999; DRURY et al., 1999a/b).

KABISCH und FROST (1994) berichten von Veränderungen der Kotkonsistenz bei erkrankten Tieren und MURO et al. (1998) beobachteten Blepharitis und Keratitis. HARPER et al. (1982) isolierten Herpesvirus-ähnliche Partikel aus einer Wüstenschildkröte, die ohne Zeichen einer Erkrankung plötzlich gestorben war.

HERVÀS et al. (2002) fanden Herpesvirus-ähnliche Partikel in der Leber einer *Agr. horsfieldii*, welche an einer multifokalen nekrotischen Hepatitis ohne weitere klinische Anzeichen oder Veränderungen anderer Organe, gestorben war.

Chronische Verlaufsformen werden selten beschrieben. BLAHAK (in MCARTHUR et al., 2002) berichtet von Fällen mit unspezifischen Symptomen wie Diarrhoe, Schluckbeschwerden und zentralnervösen Störungen.

Die Fähigkeit von Herpesviren, nach Infektion des Organismus in ein Latenzstadium, woraus es reaktiviert werden kann, überzugehen, ist auch bei Landschildkröten vorhanden, wobei das Organ der Latenz nicht bekannt ist (TEIFKE et al., 2000). Zahlreiche Autoren berichten über klinisch gesunde Tiere, welche nach immunschwächenden Umständen, wie Winterschlaf, veränderte Haltungsbedingungen, Transport, etc. zu Virusausscheidern geworden sind (HÄFELI und SCHILDGER, 1995; MURO et al., 1998; BLAHAK, 2000; MCARTHUR et al., 2002). MARSCHANG (2000) berichtet über einen Bestand, in dem das Virus auch aus gesunden Tieren isoliert werden konnte und vermutet, dass über solche klinisch unauffälligen Tiere die Infektion weitergetragen wird. Daher besteht ein be-

sonderes Interesse, seropositive Tiere mittels Serumneutralisations-Test (KABISCH und FROST, 1994; MARSCHANG et al., 1997a) oder ELISA (ORIGGI et al., 2001b; ORIGGI et al., 2003) als potentielle Virus-Überträger festzustellen. Bei Antikörpermessungen an vakzinierten Tieren fielen die Titer teilweise unter die Spezifitätsgrenze, so dass es möglich wäre, dass seropositive Tiere erst bei mehrmaligen Messungen erkannt werden (MARSCHANG et al., 2001b).

2.2.2 Speziesverteilung

Infektionen durch Herpesviren bei Landschildkröten werden bei einer Reihe von Spezies beschrieben.

Tab. 1 zeigt, aus welchen Arten bisher Herpesviren isoliert wurden, bzw. bei welchen Arten Antikörper gegen das Virus gefunden wurden.

Ausbrüche innerhalb von Beständen, in denen mehrere Arten von Landschildkröten lebten, lassen vermuten, dass innerhalb der Spezies unterschiedliche Empfänglichkeiten für das Virus existieren.

So berichten JACOBSON et al. (1985) von einem Herpesvirusausbruch in einem Bestand von *G. chilensis* und *G. carbonaria*, bei welchem nur die *G. chilensis* Krankheitsanzeichen zeigten – alle *G. carbonaria* blieben gesund.

MURO et al. (1998) beschreiben einen Krankheitsfall innerhalb einer Gruppe von *T. graeca*, *T. hermanni* und *Agr. horsfieldii*, bei der nur die *T. graeca* erkrankten.

Eine Reihe von Autoren beobachten eine besondere Resistenz von *T. graeca* gegen die Erkrankung und vermuteten, dass diese Spezies symptomloser Träger bzw. Überträger des Virus ist (KABISCH und FROST, 1994; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 2000; MCARTHUR et al., 2002).

MATHES et al. (2001) empfiehlt, die einzelnen Testudo-Spezies nur getrennt zu halten, da nicht alle seropositive Tiere auch Anzeichen des Rhinitis-Stomatitis-Komplexes zeigen und so als potentielle Virusausscheider ein äußerlich nicht erkennbares Risiko für empfindlicher reagierende Arten sein können.

Tab. 1: Schildkrötenspezies, bei denen das Landschildkröten-Herpesvirus bisher nachgewiesen wurde bzw. bei denen Antikörper (AK) gegen das Landschildkröten-Herpesvirus gefunden wurden

Spezies	Direkter Virusnachweis	AK gegen das Virus
<i>T. graeca</i> (Maurische Landschildkröte)	COOPER et al., 1988(1); MÜLLER et al., 1990(1, 2); KABISCH und FROST, 1994(1, 2, 3); MARSCHANG et al., 1997a(1, 2, 3); KÜBER-HEISS et al., 1999(1, 2, 3); BLAHAK, 2000(1, 2, 3); MARSCHANG, 2000(1, 2, 3); SCHMIDT, 2000(1, 2, 3); MARSCHANG, 2001b(3)	KABISCH und FROST, 1994; FROST und SCHMIDT, 1997; MATHES et al., 2001; MARSCHANG, 2000; SCHMIDT, 2000
<i>T. hermanni</i> (Griechische Landschildkröte)	HELDSTAB und BESTETTI, 1989(1, 2); LANGE et al., 1989(1, 2); MÜLLER et al., 1990(1, 2); BIERMANN und BLAHAK, 1993(2, 3); KABISCH und FROST, 1994(1, 2, 3); BIERMANN, 1995(1, 2, 3); MARSCHANG et al., 1997a(1, 2, 3); WENKER et al., 1997(2); KÜBER-HEISS et al., 1999(1, 2, 3); MARSCHANG, 2000(1, 2, 3); SCHMIDT, 2000(1, 2, 3); TEIFKE et al., 2000(1, 2, 3, 4); MARSCHANG et al., 2001b(3)	WITTE, 1993; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG, 2000; SCHMIDT, 2000
<i>Agr. horsfieldii</i> (Russische Landschildkröte)	BRAUNE et al., 1989(1, 2); LANGE et al., 1989(1, 2); KABISCH und FROST, 1994(1, 2, 3,); BIERMANN, 1995(1, 2, 3); KÜBER-HEISS et al., 1999(1, 2, 3); UNE et al., 1999(1, 2, 4); MARSCHANG, 2000(1, 2, 3); SCHMIDT, 2000(1, 2, 3); TEIFKE et al., 2000(1, 2, 3, 4); HERVÁS et al., 2002(1, 2)	KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG, 2000; SCHMIDT, 2000
<i>T. marginata</i> (Breitrandschildkröte)	KABISCH und FROST, 1994(1, 2, 3); SCHMIDT, 2000(1, 3); MARSCHANG, 2001b(3)	FROST und SCHMIDT, 1997; SCHMIDT, 2000
<i>Geochelone pardalis</i> (Pantherschildkröte)	BRAUNE et al., 1989(1, 2); BLAHAK, 2000(1, 2, 3)	FROST und SCHMIDT, 1997; SCHMIDT, 2000
<i>Pseudotestudo kleinmanni</i> (Ägyptische Landschildkröte)	Blahak, 2000(1, 3)	SCHMIDT, 2000

<i>Manouria emys</i> (Braune Landschildkröte)	BLAHAK, 2000(1, 3)	
<i>Malacochersus tornieri</i> (Spalten-schildkröte)	UNE et al., 1999(1, 2, 4); BLAHAK, 2000(1, 3)	
<i>Geochelone chilensis</i> (Argentinische Landschildkröte)	JACOBSON et al., 1985(1, 2); BRAUNE et al., 1989(1, 2)	SCHMIDT, 2000
<i>Geochelone elongata</i> (Gelbkopfschildkröte)	MÜLLER et al., 1990(1, 2)	
<i>T. denticulata</i> (Waldschildkröte)	MARSCHANG, 2000(2, 3)	
<i>Trionyx sinensis</i> (Chinesische Weichschildkröte)		NIE und LU, 1999
<i>Gopherus agassizii</i> (Kalifornische Wüstenschildkröte)	HARPER et al., 1982(1, 2); PETTAN-BREWER et al., 1996(1, 2); MARTINEZ-SILVESTRE et al., 1999(1, 2); ORIGGI et al., 2002 (4)	SCHMIDT, 2000; ORIGGI et al., 2002
<i>Terrapene carolina triunguis</i> (Dreizehen-Dosenschildkröte)		SCHMIDT, 2000
<i>Asterochelys radiata</i> (Strahlenschildkröte)	BLAHAK und FERTARD, 2001, unveröffent-licht(1)	SCHMIDT, 2000

1=Herpesvirus-Partikel Nachweis durch elektronenmikroskopische Untersuchung

2=Lichtmikroskopischer Herpesvirusnachweis durch typische intranukleäre Einschlusskörperchen

3=Herpesvirusnachweis durch Vermehrung in Zellkultur mit typischem cpE

4=Herpesvirusnachweis durch PCR

2.2.3 Pathologisch-anatomische und histologische Befunde

Bei der pathologisch-anatomischen Untersuchung der gestorbenen oder euthanasierten Tiere werden vor allem die diphtheroid -nekrotischen Beläge in der Mundhöhle beschrieben (JOHNSON et al., 2003), welche zum Teil über Rachen und

Ösophagus (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; BRAUNE et al., 1989; MURO et al., 1998) bis in die Bronchien und den Magen reichen (PETTAN-BREWSTER et al., 1996; UNE et al., 1999; TEIFKE et al., 2000; MCARTHUR et al., 2002).

Die Leber wird oftmals als geschwollen, blass oder gelb und brüchig angegeben (JACOBSON et al., 1985; LANGE et al., 1989; UNE et al., 1999; MARSCHANG et al., 2001).

KABISCH and FROST (1994) und MURO et al. (1998) beschreiben bei einigen betroffenen Tieren ein Lungenemphysem.

LANGE et al. (1989) diagnostiziert bei der Sektion eine Enteritis.

Histologisch erweist sich das Epithel der Mukosa von Mundhöhle, Zunge, Larynx, Ösophagus und Trachea als nekrotisch und hyperplastisch und enthält Ansammlungen von Entzündungszellen (HARPER et al., 1982; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB and BESTETTI, 1989; MÜLLER et al., 1990; PETTAN-BREWSTER et al., 1996; UNE et al., 1999; TEIFKE et al., 2000; JOHNSON et al., 2003).

KÜBER-HEISS et al. (1999) fanden frische submiliare Lebernekrosen mit fettiger Degeneration fast aller Hepatozyten und eine geringgradige herdförmige interstielle Pneumonie.

Als Hinweis auf den viralen Charakter der Erkrankung finden sich in einer Reihe von Organ-Epithelien eosinophile oder basophile virale Kern-Einschlusskörperchen, teilweise klassifiziert als Typ Cowdry A (BRAUNE et al., 1989; WENKER et al., 1997).

In folgenden Organen werden Einschlusskörperchen beschrieben:

Zunge, Larynx, Ösophagus (BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB and BESTETTI, 1989; WENKER et al., 1997; MURO et al., 1998; KÜBER-HEISS et al., 1999; TEIFKE et al., 2000; MARSCHANG, 2000), Darmepithel (LANGE et al., 1989), Trachea, Bronchus, Alveolen, Niere, Leber, Milz, Tränen- und Speicheldrüse, Ductus deferens (MÜLLER et al., 1990), ZNS (MÜLLER et al., 1990; KABISCH und FROST, 1994; WENKER et al., 1997; KÜBER-HEISS et al., 1999), Magen und Pankreas (UNE et al., 1999), Hoden und Eileiter (MARSCHANG, 2000; MCARTHUR et al., 2002).

2.2.4 Differential-Diagnosen

Als Differential-Diagnosen finden sich in der Literatur Erkrankungen infektiöser Natur, wie Mykoplasmosen (GABRISCH und ZWART, 2001; MCARTHUR, 2002), bakteriell bedingte Erkrankungen des Atmungstraktes (HÄFELI und SCHILDGER, 1995; BLAHAK, in MCARTHUR, 2002) und Iridovirusinfektionen (MARSCHANG, 1999).

Darüber hinaus existiert ein noch nicht klassifiziertes „Virus X“, welches zusammen mit Herpesviren oder Mykoplasmen, aber auch als singulärer Erreger aus Landschildkröten isoliert wurde. Dieses Agens wurde sowohl aus Tieren isoliert, die an einer diphtheroid-nekrotisierenden Stomatitis litten, als auch aus klinisch völlig unauffälligen Schildkröten, so dass über seine Bedeutung noch Unklarheit herrscht (MARSCHANG et al., 1997; MARSCHANG, 2000).

Bei Einzeltierkrankungen kommen auch Stoffwechselstörungen, orale Verletzungen durch Futterpartikel oder andere lokale Irritationen und chemische Intoxikationen in Betracht (MCARTHUR et al., 2002).

2.2.5 Direkte Nachweisverfahren

Neben den klinischen und pathologischen Befunden existieren noch einige weitere direkte Nachweisverfahren einer Herpesvirose.

Als Frühdiagnose am lebenden Tier wird der Nachweis von viralen Einschlusskörperchen anhand von Hämalaun-Eosin- oder Giemsa-gefärbten Zungenabklatschpräparaten empfohlen (MÜLLER et al., 1990; HÄFELI und SCHILDGER, 1995; SCHUMACHER, 1996; BLAHAK, 2000).

ORIGGI et al., (2001b) und ORIGGI et al. (2003) beschrieben den Nachweis von Virusantigenen in infizierten Zellkulturen und Gewebsschnitten mit Hilfe der Immunoperoxidase-Technik.

Eine Reihe von Autoren beschreibt den elektronenmikroskopischen Nachweis von Herpesvirus-ähnlichen Partikeln aus Gewebeproben, in denen vorher lichtmikroskopisch Einschlusskörperchen festgestellt wurden. Es handelt sich sowohl um intranukleäre hexagonale unbehüllte Nukleokapside, als auch um intrazytoplasmatische Partikel mit Lipidhülle, deren Größe von ca. 80-100 nm im Kern bis 110-150 nm im Zytoplasma angegeben wurden (HARPER et al., 1982; JACOBSON et al.,

1985; BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; MÜLLER et al., 1990; KÜBER-HEISS et al., 1999).

KABISCH und FROST (1994), MARSCHANG et al. (1997a) und DRURY et al. (1999a) untersuchten elektronenmikroskopisch den Überstand von TH-Zellkulturen, die sie zuvor mit virushaltigem Material verimpft hatten und die einen typischen cpE zeigten. Auch hier fanden sich sowohl behüllte als auch unbehüllte Herpesvirus-ähnliche Partikel.

Nachdem zunächst LANGE et al. (1989) auf Zellkulturen aus embryonierten Schildkröteneiern, die bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C mit verschiedenen Organproben inokuliert wurden, kein zytopathogenes Agens isolieren konnten, gelang es erstmals BIERMANN und BLAHAK (1993) mit Gewebe von Gehirn, Lunge, Trachea, Darm und Leber auf Turtle Heart cells bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C einen für Herpesviren typischen cpE zu erzielen. Gleiches gelang bei dieser Inkubationstemperatur KABISCH and FROST (1994) auf Zellkulturen aus embryonierten Schildkröteneiern, die mit Suspensionen aus Milz, Leber und Gehirn beimpft wurden und KÜBER-HEISS (1999) auf Hühnerembryofibroblasten.

Nachfolgend wurden noch aus Zunge, Trachea, Pharynx, Lunge, Herzmuskel und Darm Herpesviren auf TH-Zellen isoliert und vermehrt (MARSCHANG et al., 2000).

Die kulturelle Vermehrung von Herpesviren aus Zungen- und Rachentupfern auf TH-Zellen wird als geeignete Möglichkeit angesehen, eine Herpesvirose am lebenden Tier zu diagnostizieren (MARSCHANG et al., 1997a; BLAHAK, 2000).

2.2.6 Molekularbiologische Nachweis- und Differenzierungsverfahren

In den letzten Jahren wurde eine Reihe von PCR-Protokollen veröffentlicht, die für den Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA entwickelt wurden. Dabei wurden Teilabschnitte verschiedener Gene als Zielsequenz genutzt.

TEIFKE et al. (2000) klonierten und sequenzierten einen Abschnitt des UL-5 Gens eines Virusisolates einer *T. hermanni*. Sequenzvergleiche dieses Abschnitts ergaben mehr als 50 % Ähnlichkeit mit Alphaherpesvirinae. Aus der DNA-Sequenz

dieses Gen-Abschnitts wurden Primer hergestellt, die mittels PCR zur Synthese von Digoxigenin-markierten Sonden genutzt wurden. Anschließend *in situ*-Hybridisierung an Geweben von erkrankten Tieren zeigte Signale unter anderem in Endothelzellen zahlreicher thrombosierter Gefäße von Haut, Intestinum und Zunge, welches als ein weiterer Hinweis auf den systemischen Charakter der Erkrankung gewertet wurde.

UNE et al. (1999) und MARTINEZ-SILVESTRE et al. (2001) wiesen Landschildkröten-Herpesvirus-DNA im Gewebe infizierter Schildkröten (*M. tornieri* und *Agr. horsfieldii* bzw. *T. graeca*) nach. Die Autoren nutzten dabei degenerierte Primer nach VAN DEVANTER et al. (1996), die einen Abschnitt des DNA-Polymerase-Gens der Herpesviridae amplifizieren.

Ausgehend von der PCR nach VAN DEVANTER et al. (1996) entwickelten MURAKAMI et al. (2001) ein PCR-Protokoll speziell für Landschildkröten-Herpesvirus DNA, indem sie das PCR-Produkt eines Herpesvirus-Isolates einer *Agr. horsfieldii* sequenzierten und nach dieser DNA-Sequenz spezielle Primer synthetisierten. Bei Vergleichen mit anderen bekannten Herpesvirus-Sequenzen zeigte sich auch hier eine enge Beziehung zu Alphaherpesviren.

ORIGGI et al. (2000) entwickelten eine PCR, die einen Teil des Ribonukleotid-Reduktase-Homologs von Landschildkröten vervielfältigt.

2.2.7 Biologische Charakterisierung

Die Möglichkeit der Vermehrung des Virus *in vitro* eröffnete weitere Möglichkeiten zur Differenzierung.

So konnte BIERMANN (1995) Virusisolate aus zwei *T. hermanni* und einer *T. horsfieldii* hinsichtlich ihrer Größe, Thermostabilität, pH-Stabilität und Vermehrungskinetik charakterisieren. Dabei zeigt das Isolat der *Agr. horsfieldii* (1432/94) eine signifikant höhere Thermostabilität als die beiden anderen Isolate, 2245/92 und 2246/92, die aus der Spezies *T. hermanni* stammen. Auch bei der Präferenz zu verschiedenen Zelllinien ergeben sich Unterschiede: So vermehrt sich das Isolat 1432/94 nur auf Schildkrötenherzzellen (TH-1) und auch nur bei einer Bebrütungstemperatur von 28 °C. Die anderen beiden Isolate vermehren sich bei dieser Temperatur zusätzlich noch auf Vogel- und Säugetierzellen. Bei dem Isolat

2245/94 ist auf zwei Zelllinien eine schwache Reproduktion auch noch bei 37 °C möglich.

MARSCHANG et al. (1997a) testeten die Empfindlichkeit des Virus gegenüber Aciclovir und Ganciclovir *in vitro* und stellten eine Empfindlichkeit des Virus gegenüber diesen Virostatika fest.

2.2.8 Serumneutralisationstests bei Landschildkröten

Eine Reihe von Autoren nutzte den Neutralisationstest für weitere Differenzierungen, *in vitro* Diagnostik und für Untersuchungen zur Verbreitung des Virus in unterschiedlichen Populationen (WITTE, 1993; KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 1999; NI und LU, 1999; MARSCHANG, 2000; SCHMIDT, 2000; MARSCHANG et al., 2001a; ORIGGI et al., 2001a; MARSCHANG und SCHNEIDER, 2002; MARSCHANG et al., 2003; MATHES, 2004).

BIERMANN (1995) testete in Kreuzneutralisationstests die verwandtschaftlichen Beziehungen von drei Herpesvirus-Isolaten, die aus zwei *T. hermanni* (2245/92 und 2246/92) und aus einer *Agr. horsfieldii* (1432/94) isoliert worden waren. Dabei ergibt sich bei den Isolaten aus den *T. hermanni* eine klare verwandtschaftliche Beziehung, die sich sowohl in dem r-Wert (0,83) als auch in der prozentualen Neutralisationskapazität (80 % und 86,7 %) zeigt. Das Isolat 1432/94 der *Agr. horsfieldii* dagegen lässt sowohl von den r-Werten (0,39; 0,42) als auch von den prozentualen Neutralisationskapazitäten her (46,1 %; 38,5 %) keine serologische Verwandtschaft zu den beiden anderen Isolaten erkennen. Ebenfalls durchgeführte Neutralisationstests mit Antiseren gegen aviäre Herpesviren erbrachten keine Verwandtschaftsbeziehungen zu diesen Viren.

MARSCHANG (1999), MARSCHANG (2000) und MARSCHANG et al. (2001a) ermittelten Antikörper-Titer verschiedener Landschildkröten-Seren gegen verschiedene Schildkröten-Herpesvirusisolate und fanden ein Isolat, gegen das keines der untersuchten Seren messbare Antikörper besaß. Die Autoren schließen daraus, dass dieses Isolat einen anderen Serotyp darstellt.

NI und LU (1999) testeten Serumproben von Weichschildkröten (*Trionyx sinensis*) in der chinesischen Provinz Jiangsu auf Herpesvirus-Antikörper und fanden nur bei einem geringen Prozentsatz von 6,6 % Titer oberhalb der Spezifitätsgrenze.

MARSCHANG und SCHNEIDER (2002) testeten Serumproben von Wildfängen der Spezies *T. graeca* aus der Türkei auf Antikörper gegen zwei verschiedene Serotypen. Dabei fanden sie bei 37 % der Schildkröten Antikörper gegen den Serotyp I und bei einem geringen Prozentsatz (5,5 %) Antikörper gegen Serotyp II.

MATHES (2004) untersuchte Schildkröten-Serum von freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen *T. hermanni*, *T. graeca graeca* und *T. graeca iberica* in Frankreich und Marokko und fand bei 11,9 % der in Gefangenschaft lebenden Tiere Antikörper gegen das Herpesvirus. Dagegen war keine der Proben von freilebenden Landschildkröten positiv.

SCHMIDT (2000) unternahm Untersuchungen zur Seroprävalenz von Landschildkröten-Herpesvirus in Deutschland. Insgesamt waren 15,9 % der untersuchten Proben seropositiv, wobei innerhalb der einzelnen Spezies große prozentuale Unterschiede vorhanden waren.

2.2.9 Einteilung von Schildkröten-Herpesviren nach Wirtsspektrum und Erstbeschreibung

Nach dem vermutlichen Wirtsspektrum und der Reihenfolge ihrer Erstbeschreibung teilen MINSON et al. (2000) die Schildkröten-Herpesviren in vier Gruppen (Chelonian Herpesvirus 1-4, ChHV-1-4) ein. ChHV-1 wurde im Zusammenhang mit der Grauflecken-Krankheit aus einer *Chelonia mydas* isoliert (REBELL et al., 1975). ChHV-2 stammt aus einer an einer Lebernekrose verstorbenen *Clemmys marmorata* (FRYE et al., 1977) und als ChHV-3 wird ein Herpesvirus bezeichnet, das aus *Chrysemys picta* und *Graptemys pseudogeographica* isoliert wurde, die ebenfalls an einem ähnlichen Krankheitsbild gestorben waren (COX et al., 1980; JACOBSON et al., 1982). ChHV-4 stammt aus einer *Geochelone chilensis* mit nekrotisierender Stomatitis (JACOBSON et al., 1985).

2.3 Herpesviren bei Wasser- und Meeresschildkröten

Auch bei Wasser- und Meeresschildkröten sind Erkrankungen durch Herpesviren beschrieben worden.

2.3.1 Herpesviren bei Wasserschildkröten

FRYE et al. (1977) berichten von zwei adulten Pazifik-Wasserschildkröten (*Clemmys marmorata*), welche als Symptome Schwäche, Anorexie und ekchymale Hautblutungen zeigten. Pathologisch-histologisch fand sich eine akute Lebernekrose und elektronenmikroskopisch wurden in Leber und Milz herpesvirusähnliche Partikel entdeckt. Der Versuch einer Virusanzüchtung wurde nicht unternommen.

Ein weiterer Einzelbericht beschreibt eine in Gefangenschaft lebende Zierschildkröte (*Chrysemys picta*), bei welcher nach ihrem Tod eine Lungenentzündung und eine Lebernekrose gefunden wurde (COX et al., 1980).

Auch hier wurden in Lunge und Leber elektronenmikroskopisch Partikel nachgewiesen, die aufgrund ihrer Größe und Struktur den Herpesviren zugeordnet wurden. Eine Vermehrung der Partikel auf Reptilienzellen fand auch hier nicht statt.

JACOBSON et al. (1982) wiesen in zwei Höcker-Schmuckschildkröten (*Graptemys pseudogeographica* und *Graptemys barbouri*), welche an subkutanen Ödemen und Nekrosen in Leber Niere und Pankreas litten, ebenfalls herpesvirusähnliche Partikel nach. Ein Übertragungsversuch und der Versuch einer Anzüchtung des Virus brachte keinen Erfolg.

2.3.2 Herpesviren bei Meeresschildkröten

JACOBSON et al. (1986) gelang es, Herpesviren aus Suppenschildkröten (*Chelonia mydas*) auf Zellkulturen anzuzüchten.

Es handelte sich um einen Bestand, bei dem es seit Jahren immer wieder zu seuchenhaft bis chronisch verlaufenden Erkrankungen des Atmungstraktes kam (Lung, Eye and Trachea Disease = LETD). Die Tiere litten an Atemnot, verminderter Schwimm- und Tauchfähigkeit und Konjunktivitis. Pathologisch-histologisch wurde eine Tracheitis und Bronchopneumonie festgestellt.

Bei einer Untersuchung von Serumproben wildlebender Suppenschildkröten in Florida gelang es mittels ELISA, Antikörper gegen das Virus nachzuweisen (COBERLEY et al., 2001).

Eine weltweite Gefahr für die Erhaltung der Population stellt die Fibropapillomatose der Suppenschildkröten (Green turtle fibropapillomatose = GTFP) dar (JACOBSON et al., 1991; HERBST et al., 1995; QUACKENBUSH et al., 1998).

Von der Erkrankung betroffen sind neben Suppenschildkröten (*Chelonia mydas*) auch die unechte Karettschildkröte, *Caretta caretta*, (QUACKENBUSH et al., 1998, LACKOVICH et al., 1999), Olive Bastard Schildkröten (*Olive ridley turtles*) (QUACKENBUSH et al., 1998) und weitere Meeresschildkröten (Olive Bastard Schildkröten, *Lepidochelys olivaceus* und Flachrückenschildkröten, *Natator depressus*, HERBST, 1994).

Symptome der Erkrankung sind Fibropapillome, die Haut und weichen Panzer, aber auch die Augenhäute, Cornea und innere Organe betreffen können (JACOBSON et al., 1991; BROOKS et al., 1994; HERBST, 1994).

Obwohl über die Ätiologie der Erkrankung noch keine endgültige Klarheit besteht, verdichten sich die Hinweise, dass ein infektiöses Agens dafür verantwortlich ist.

In den Papillomen wurden elektronenmikroskopisch virusähnliche Partikel, welche nach Gestalt und Größe zu den Herpesviren gehören, entdeckt (JACOBSON et al., 1991).

QUACKENBUSH et al. (1998) und LACKOVICH et al. (1999) gelang es, Herpesvirus-DNA in Fibropapillomen nachzuweisen.

Obwohl nach Übertragungsversuchen mit zellfreier Tumorgewebssuspension infizierte Schildkröten an Fibropapillomatose erkrankten, gelang es bisher nicht, das Virus in Zell- oder Eikulturen anzuzüchten (HERBST und KLEIN, 1995).

Während die häufig in Fibropapillomen nachgewiesenen Trematodeneier nach serologischen und statistischen Untersuchungen als Erreger ausgeschlossen werden können (HERBST et al., 1998), scheinen Umweltfaktoren, wie erhöhte Schadstoffkonzentrationen in küstennahen Gewässern, die Dichte der Population oder chronische Stresszustände, an der Ausprägung des Krankheitsbildes beteiligt zu sein (AGUIRRE et al., 1995; HERBST und KLEIN, 1995).

REBELL et al. (1975) berichten über Suppenschildkröten (*Chelonia mydas*), welche während der ersten 6 Lebensmonate an Hautläsionen erkrankten, die entweder aus umschriebenen papulären Veränderungen bestanden oder sich als graue Flecken mit oberflächlicher Nekrose der Epidermis ausbreiteten („Gray-Patch disease“).

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Gewebeläsionen ergaben Herpesvirus-ähnliche Partikel. Übertragungsversuche, bei denen Gewebesuspensionen von erkrankten Tieren in die Haut gesunder Tiere gebracht wurde, konnten das gleiche Krankheitsbild hervorrufen.

Die schon von den Autoren geäußerte Vermutung, haltungsbedingte Stressfaktoren könnten die Ausbildung des Krankheitsbildes beeinflussen, wurde von KLEESE (1980) bestätigt. Er setzte Suppenschildkröten in Versuchen Haltungsbedingungen, wie ungünstige Temperaturen, hohe Besatzdichte und schlechte Hygienebedingungen aus, welche die Ausprägung des Krankheitsbildes negativ beeinflussten.

2.4 Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen und die Auftrennung der erhaltenen Fragmente im Agarosegel ermöglicht den Vergleich von Organismen auf molekularbiologischer Ebene.

Restriktionsendonukleasen wurden aus Prokaryoten isoliert. Sie sind in der Lage, spezielle Sequenzen von 4-8 Basenpaaren innerhalb doppelsträngiger DNA zu erkennen und die DNA zu spalten.

Der Begriff „Restriktionsendonuklease“ besitzt seinen Ursprung in einer von LURIA und HUMAN (1952) gemachten Beobachtung, wonach sich der Bakteriophage Lambda in einem Bakterienstamm *E. coli*C mit einem um 3 bis 5 Größenordnungen höheren Titer vermehrte als in Bakterienstamm *E. coli*K. Diejenigen Phagenpartikel, die trotzdem entstanden, waren insofern modifiziert, dass sie sich anschließend gut im Stamm K, aber nicht mehr in Stamm C vermehrten. Dieses Phänomen der Restriktion und Modifikation wurde von ARBER und LINN (1969) erklärt. Sie entdeckten Restriktionsendonukleasen, welche fremde DNA spalten

können, während die eigene DNA durch Methylierung bestimmter Basen an der Erkennungsstelle des Enzyms geschützt ist. Haben sich jedoch einige Bakteriophagen trotzdem in dem Bakterienstamm durchgesetzt, trägt ihre DNA nun das spezifische Methylierungsmuster des neuen Bakterienstammes und wird in diesem nicht mehr als fremd erkannt.

Die Nomenklatur der Restriktionsendonukleasen setzt sich in den ersten drei kursiv gedruckten Buchstaben zusammen aus dem Anfangsbuchstaben der Gattung und den ersten zwei Buchstaben des Artnamens des Bakteriums aus welchem das Enzym isoliert wurde (z.B. *Escherichia coli* = *Eco*). Dahinter folgt nicht kursiv die Bezeichnung des Stamms oder Typs (z.B. *EcoR*) und als Abschluss die Ordnungsnummer der isolierten Restriktionsendonuklease in lateinischen Ziffern (z.B. *EcoRI*) (SMITH und WILCOX, 1970; SMITH und NATHANS, 1973).

Anhand ihres Aufbaus werden Restriktionsendonukleasen in drei Typen unterteilt: Typ I Restriktionsenzyme sind zugleich Endonukleasen und Methylasen, welche unmethylierte DNA spalten, während hemimethylierte DNA methyliert wird. Sie bestehen aus 3 Untereinheiten, wobei die S-Untereinheit die 15 Basenpaare lange DNA-Sequenz erkennt, die M-Untereinheit methyliert und die R-Untereinheit an unspezifischer Stelle schneidet.

Typ II Restriktionsenzyme bestehen aus zwei unabhängigen Proteinen, Restriktionsenzym und Methylase, die beide die Zielsequenz erkennen und an genau definierter Stelle schneiden (SMITH und WILCOX, 1970; SMITH und NATHANS, 1973).

Typ III Restriktionsenzyme bestehen ebenfalls aus mehreren Untereinheiten und erkennen spezifische Sequenzen, jedoch schneiden sie 20-25 Nukleotide entfernt davon.

Damit haben Typ II Endonukleasen die weitaus größte Bedeutung, da nur sie reproduzierbare Ergebnisse liefern.

Enzyme, welche die gleiche Sequenz erkennen und in gleicher Weise schneiden, bezeichnet man als Isoschizomere. Neoschizomere erkennen ebenfalls die gleiche Sequenz, schneiden aber anders.

2.4.1 Auftrennung von Restriktionsfragmenten durch Elektrophorese im Agarosegel

Bei der Elektrophorese werden geladene Teilchen durch Wanderung im elektrischen Feld aufgetrennt. Die Phosphatgruppen der DNA-Moleküle sind unter elektrophoretischen Bedingungen ionisiert und die Desoxynukleotide liegen als Polyanion vor, so dass sie sich im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode bewegen.

Verschiedene Faktoren, wie Fragmentgröße, Konzentration der Agarose, DNA-Konfiguration, Spannung, Basenzusammensetzung, Temperatur, Elektrophoresepuffer und Richtung des elektrischen Feldes beeinflussen die Wanderung der DNA-Fragmente im Agarosegel (MANIATIS et al., 1984). Zum direkten Vergleich der Spaltmuster der verschiedenen Isolate werden diese nebeneinander auf ein Agarosegel aufgetragen. Zusätzlich werden DNA-Fragmente bekannter Größe als Größenfragment mitgeführt.

Nach erfolgter Auftrennung werden die Fragmente durch Ethidiumbromid gefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA, so dass diese unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann (WINNACKER, 1985). Die dabei sichtbar werdenden Banden besitzen eine verschiedene Leuchtintensität. Man unterscheidet supermolare Banden hoher Leuchtintensität, die durch Überlagerung zweier oder mehrerer Banden ähnlicher Größe zustande kommen und submolare Banden schwächerer Intensität, bei denen unterschiedliche Spalteffizienz der Restriktionsenzyme, defekte DNA oder Isomere von Rekombinanten innerhalb eines Virustyps als Ursache angenommen werden (KOTIW et al., 1982; LEIB et al., 1986; KEELER et al., 1993).

2.4.2 Charakterisierung und Differenzierung von Herpesviren anhand des Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Eine Reihe von Autoren nutzt RFLP zur Charakterisierung und Differenzierung von Herpesviren, die aus Vögeln, Säugetieren und dem Menschen isoliert wurden. Dabei werden zum einen Isolate aus einzelnen Ausbrüchen untereinander und mit Referenz- und Impfstämmen verglichen und aus Unterschieden im Fragmentmus-

ter eine Basis für weitere Studien geschaffen (TISDALL et al., 1984; CHRISTENSEN, 1988; ANDREASEN et al., 1990; GRAIL und HARBOUR, 1990; BUBLOT et al., 1991; AINI et al., 1993; KIRISAWA et al., 1993; XUAN et al., 1993; GÜNTHER, 1995; GRAVENDYCK, 1996; PRATELLI et al., 1999; PRATELLI et al., 2000). Zum anderen wird RFLP als Hilfsmittel zur Virustypisierung und zur Unterscheidung von Virussubtypen genutzt (ARENS und SWIERKOSZ, 1983; PIDONE et al., 1999; D'ARCE et al., 2002). Ebenfalls verwendet wird RFLP in epidemiologischen Studien, beispielsweise zur Analyse von Infektketten (ROIZMAN und TOGNON, 1983; MODROW et al., 2003).

Auch Herpesviren, die bei Landschildkröten gefunden wurden, wurden durch Restriktionsendonukleasespaltung untereinander und mit aviären Herpesviren verglichen (MARSCHANG et al., 1997b; MARSCHANG, 2000; MARSCHANG et al., 2001a). Die Herpesviren, die aus Landschildkröten isoliert wurden, waren sich untereinander sehr ähnlich, bis auf ein Isolat, das aus einer *Agr. horsfieldii* isoliert wurde und sich deutlich von den anderen untersuchten Isolaten unterschied. Zu den Spaltmustern der aviären Herpesviren zeigten sich keine Ähnlichkeiten.

2.5 Polymerase chain reaction (PCR)

Bei der PCR (polymerase chain reaction) handelt es sich um ein sensitives, spezifisches und schnelles Verfahren zur Vervielfältigung von Nukleinsäure-Abschnitten. So kann die Erbsubstanz verschiedener Mikroorganismen in einer Reihe von Proben, wie Speichel, Serum, Liquor, Urin, Faezes, Gewebe und Zellkulturen, nachgewiesen werden (DE WITT et al., 1991; VICTOR et al., 1992; CARTY et al., 2001; RENO et al., 2001; DE BIASI et al., 2002).

SAIKI et al. veröffentlichten 1985 das Originalprotokoll, bei dem die Vervielfältigung des β -Globingens zur praenatalen Diagnostik der Sichelzellenanämie beschrieben wird.

Das Reaktionsprinzip der PCR basiert auf einem dreistufigen, sich wiederholenden Vorgang (LACHMUND und SACHSE, 1994):

- Denaturierung der doppelsträngigen DNA durch hohe Temperatur (bei ca. 90 °C)
- Annealing von kurzen Oligonukleotidprimern an eine komplementäre Nukleotidsequenz der beiden DNA-Matritzenstränge (bei ca. 50 °C)

-Polymerisation in Form von enzymatischer Verlängerung der Primer durch eine Polymerase durch Addition von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs).

Bei der nested-PCR wird ein erhaltenes Amplifikat als Template für eine Reamplifikation verwendet, wobei Primer zum Einsatz kommen, die an dieses Amplifikat binden. Mindestens ein neuer Primer bindet dabei intern des ersten Amplifikates, so dass nur das spezifische Produkt der ersten PCR als Substrat der zweiten PCR fungiert. Auf diese Weise kommt es zu einer Steigerung der Sensitivität und Spezifität (NEWTON und GRAHAM, 1994).

CHAMBERLAIN et al. (1988) entwickelten eine andere Erweiterung der PCR. Hierbei werden mehre Abschnitte einer DNA mit mehreren Primern in einem Ansatz amplifiziert (Multiplex PCR). Durch diese Methode können mehrere Erreger gleichzeitig in einem PCR-Durchgang nachgewiesen werden, oder es können in einem Ansatz verschiedene Virus-Typen unterschieden werden (READ and KURTZ, 1999; SYKES et al., 2001; VARRASSO et al., 2001).

Ferner kann die PCR-Ausbeute und -Spezifität erhöht werden, indem innerhalb des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ein weiterer Primer (seminested PCR) oder ein weiteres Primerpaar (nested PCR) ansetzt, so dass ein größeres und ein kleineres Fragment erhalten wird (SCHULTE und SACHSE, 1994).

In der Virusdiagnostik hat die PCR verschiedene Vorteile. Zum einen ist der Zeitaufwand geringer als bei kulturellen Verfahren. Ferner gelingt mit der PCR auch der Nachweis latenter oder nicht kultivierbarer Viren wie des humanen Papillomavirus oder das Virus der Fibropapillomatose (QUACKENBUSH et al., 1998; LACKOVICH et al., 1999).

Im Gegensatz zu serologischen Verfahren wird das Virus durch Nachweis eines Abschnitts seiner DNA direkt erfasst und nicht die serologische Reaktion des Wirts auf den Erreger (WHITE et al., 1992).

2.5.1.1 Primer

Ein Primer besteht aus einer kurzen Nukleotidsequenz, welche komplementär zu dem Abschnitt der DNA ist, welche vervielfältigt werden soll.

Er bildet die Anfangsstelle für die Verlängerung des neuen DNA-Moleküls.

Primer bestehen gewöhnlich aus 18-30 Basen mit einem Anteil von 50-60 % Guanin und Cytosin. Die eingesetzte Primer-Menge sollte zwischen 3-10 pmol liegen, da zu hohe Konzentrationen zu unspezifischen Produkten führen und die Bildung von Primer-Dimeren begünstigen. Die Schmelztemperatur sollte 55-80 °C betragen, um eine ausreichend hohe Annealingtemperatur zu erlauben (NEWTON und GRAHAM, 1994). Niedrige Annealing-Temperaturen können unspezifische Primer-Bindungen hervorrufen und zu unerwünschten Nebenprodukten führen.

Im Gegensatz zu diesen nicht-degenerierten Primern, welche aus einer definierten Nukleotid-Sequenz bestehen, existieren noch degenerierte Primer, die weniger spezifisch durch ein Gemisch von verschiedenen Basen an bestimmten Positionen sind.

Durch Entwicklung von degenerierten Primern, die von übereinstimmenden Sequenzen hochkonservierter Genregionen stammten (consensus primer), konnten so Viren mit bisher unbekannter DNA-Sequenz gefunden und typisiert werden (VAN DEVANTER et al., 1996; HARNISH et al., 1999; RUPASINGHE et al., 1999; LI et al., 2002)

2.5.1.2 DNA-Polymerase

Die DNA-Polymerase katalysiert aus einzelnen Desoxynukleotiden die Synthese einer Polynukleotidkette, welche komplementär zu der DNA-Matrize ist. Als Startmolekül dienen die Primer. Die Konzentration der Polymerase sollte zwischen 1-2,5 Units/100 µl-Ansatz liegen, da zu hohe Konzentrationen zu unspezifischen Produkten führen und zu niedrige Mengen die Ausbeute des zu erwartenden Produktes verringern.

Die seit der Veröffentlichung von SAIKI et al. (1988) am meisten genutzte und am ausführlichsten beschriebene Polymerase ist die thermostabile Taq-Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert wurde. Der bei etwa 70-75 °C wachsende Stamm wurde aus einem Geysir im Yellowstone Nationalpark isoliert (CHIEN et al., 1976).

Neben dieser Polymerase wurden eine Reihe von weiteren thermostabilen Polymerasen aus anderen Organismen isoliert (z.B. Pfu aus *Pyrococcus furiosus*, Pwo aus *Pyrococcus woesei* und Tth aus *Thermus thermophilus*).

2.5.1.3 Magnesiumchlorid

Mg²⁺ ist Co-Faktor der Enzymaktivität und beeinflusst

- a) Primer-Annealing
- b) Schmelztemperatur der doppelsträngigen DNA
- c) die Produktspezifität
- d) Primer-dimer-Bildung
- e) Enzym-Genauigkeit

Die MgCl₂-Konzentration im Reaktionsansatz kann innerhalb der Größe 0,5-5,0 mM variiert werden. MgCl₂ bildet einen Komplex mit den dNTPs, welcher essenziell für deren Einbau ist. Daneben stimulieren sie die Aktivität der Polymerase, die bei Abwesenheit von freiem Magnesium inaktiv ist. Andererseits wird die Enzymgenauigkeit bei einem Überschuss von Magnesium reduziert und führt zu unspezifischen Amplifikationen.

2.5.1.4 Inhibitoren

PCR Inhibitoren können zu falsch negativen Ergebnissen führen (WHELEN and PERSING, 1996).

Sie können beispielsweise die korrekte Aufarbeitung der klinischen Probe durch Störung der Zell-Lysis verhindern, die Ziel-DNA-Konzentration erniedrigen oder die Polymeraseaktivität hemmen (WILSON et al., 1997).

Die Art der Inhibitoren hängt davon ab, welches biologische Material und welche Reagenzien verwendet werden, um die DNA zu extrahieren.

Inhibitoren in einer Probe können identifiziert werden, indem in diese Probe kleine Mengen der Ziel-DNA gegeben werden, deren Amplifikation dann verhindert wird (Spiking).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Substanzen und Geräte für die Gewinnung, Isolierung und Charakterisierung der Virusisolate

Mikroskop

Telaval 31 (Zeiss, Jena)

Kamera

Contax 167 MT (Kyocera Corporation, Tokyo, Japan)

Zellschaber

Disposable Cell Scraper (Costar Corporation, Cambridge, MA, USA)

CO₂-Begasungsbrutschrank

BB 620 931 0860 (Kendro, Hanau)

Zellkulturgefäße

Greiner, Frickenhausen oder Corning Incorporation, Corning, New York, USA

Minimum Essential Medium Eagle (MEM) mit Earle`s Salzen (2 Liter)

19,36 g MEM (Seromed, Biochrom Berlin)

1,7 g NaHCO₃

20 ml Non essential Aminoacids

Gelöst in Aqua dest.

Zellkultur

Terrapene Heart-Zellen (TH-1), subline B1, ECACC No. 90102528

Chloroform

Pro analysis, (Merck, Darmstadt)

5-Jodo-2`-Desoxyuridin (IUDR)

250 mg, Sigma-Aldrich, Schneldorf

Trypsin

8,0 g/l Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)

0,2 g/l Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt)

1,15 g/l di-Natriumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt)

1,0 g/l Glukose (Merck, Darmstadt)

10,0 g/l Trypsin (1:250) (Serva, Heidelberg)

20 ml/l Kanamycin (Biochrom, Cambridge, UK)

gelöst in Aqua dest und mit 1 M NaOH auf pH 7,2-7,4 eingestellt

**3.1.2 Substanzen und Geräte für die Spaltung von DNA durch Restriktion-
sendonukleasen****DNA-Extraktionskit**

NucleoSpin Tissue® (Machery-Nagel, Düren)

Komponenten:

1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße

2 ml Zentrifugen-Auffanggefäße

NucleoSpin® Tissue Säulen

Lösung T1 (Lysispuffer, Kitkomponente)

Proteinase K (20 mg/ml)

Lösung B3 (Bindungspuffer; Kitkomponente)

Ethanol (96 %)

Lösung BW (Waschpuffer, Kitkomponente)

Lösung B5 (Waschpuffer, Kitkomponente)

Lösung BE (Elutionspuffer 0 5 mM TRIS/HCL, pH 8,5, Kitkomponente)

Restriktionsendonukleasen

BamH I, Hind III, Sal I (Promega Corporation, Madison, WI, USA)

50 x TAE-Puffer für die Agarosegelelektrophorese

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

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

100 ml/l 0,5 M EDTA (Sigma, St. Louis, USA)

Gelöst in Aqua dest., mit konz. HCl auf pH 8,5 eingestellt

0,7% Agarosegel

7 g/l Agarose (Biozym, Hess. Oldendorf)

gelöst in TAE-Puffer.

Auftragepuffer für die Agarosegelelektrophorese

2,5 g/l Bromphenolblau (Serva)

2,5 g/l Xylenocyanol (Serva)

400 g/l Saccharose (Serva)

gelöst in Aqua dest.

DNA-Marker

DNA-Molecular-Weight Marker XV, Roche Diagnostics, Mannheim (Abb. 2)

1-kb-DNA-step-Ladder, Promega, Madison, WI, USA (Abb. 3)

3.1.3 Substanzen und Geräte für den Nachweis von DNA durch PCR**Sicherheitswerkbank**

Herasafe (Kendro, Hanau)

dNTPs

Sigma, Steinheim

Je 10 µM/100 µl dATP, dTTP, dCTP und dGTP

Gebrauchslösung: 10 µl jedes Nukleotids wurden 160 µl Aqua bidest hinzugefügt.

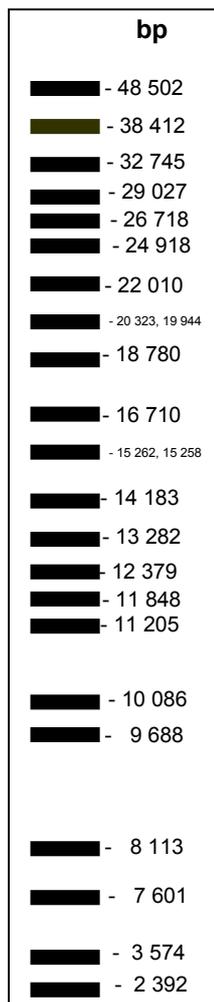


Abb. 2: Marker XV (bp = Basenpaare)

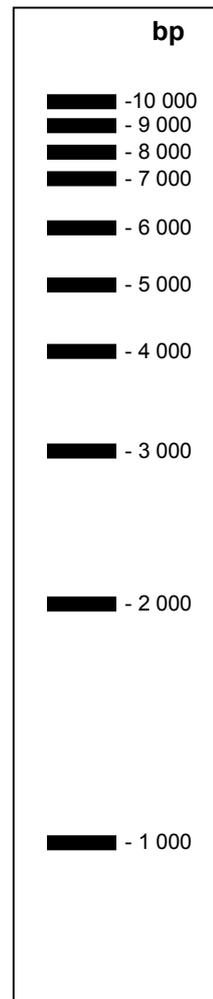


Abb. 3: 1kb-Marker (bp = Basenpaare)

10x PCR-Reaktionspuffer

Quiagen, Hilden

Taq DNA Polymerase

5 Units/ μ l, Quiagen, Hilden

MgCl₂

25 mM, Qiagen, Hilden

Primer

Biometra, Göttingen

Primer F2 und R2 (TEIFKE et al., 2000)

Primer U-73, L-588 und U-289 (MURAKAMI et al., 2001)

Primer DFA, ILK, KG1, TGV und IYG (VAN DEVANTER et al., 1996)

Thermocycler

PTC-200 (Biozym, Hess. Oldendorf)

DNA-Marker

P815, Molekularbiologisches und biochemisches Labor Dr. Bartling, Bielefeld

(Abb. 4)

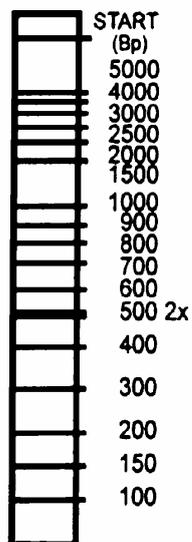


Abb. 4: DNA-Marker P815 (Bp= Basenpaare)

1,7% Agarosegel

17g/l Agarose (Biozym, Hess.-Oldendorf)

gelöst in TAE-Puffer.

3.1.4 Weitere Materialien und Geräte

Zentrifugen: Varifuge und Biofuge	(Kendro, Hanau)
Gelelektrophoresekammer: Biometra Agagel Maxi	(Biometra, Göttingen)
Spannungsgerät: PS 500 XT	(Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Wasserbad: WB/OB7-45	(Mettler, Schwabach)
Blockthermostat Unitek HB130	(Faust, Bochum)
Dokumentations- und Analysesystem Alphaimager TM 2000	(Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California)
Autoklav: Technoklav 50	(Technomara, Fernwald)
Kühlschrank und Tiefkühlschrank	(Liebherr, Ochsenhausen)
Pipetten: 1-10 µl, 10-100 µl und 20-1000 µl	(Eppendorf, Hamburg)
Mikrowelle Privileg 8017	(Quelle-Schickedanz, Fürth)
pH-Meter: 766, Calimatic	(Elektronische Messgeräte GmbH, Berlin)
Präzisionswaage: 770/GS/GJ	(Kern, Balingen-Frommern)

3.1.5 Untersuchte Proben

Vorbericht, klinische Befunde und Ergebnisse der Untersuchungen

Vorbericht, klinische Befunde und Ergebnisse der Untersuchungen wurden zunächst den Begleitschreiben, die den eingesandten Proben bzw. Tierkörpern beilagen und dem Sektionsbericht bzw. dem Bericht über die bakteriellen, parasitären und virologischen Untersuchungen entnommen.

Zur Ergänzung des Vorberichts wurde an alle Tierhalter bzw. behandelnden Tierärzte ein Fragebogen versandt. Der Fragebogen beschäftigte sich mit Haltungsbedingungen, Speziesverteilung in dem Bestand, der Frage, welche Spezies erkrankten und welche die Infektion überstanden hatten, dem jahreszeitlichen Auftreten der Symptome und dem vermutlichen Infektionsweg.

Informationen über Virusisolate, die von Tieren stammten, die nicht im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt untersucht wurden, sondern von anderen Personen zur Verfügung gestellt worden waren, wurden deren Veröffentlichungen – zumeist Dissertationen - entnommen.

Virusisolate für die Restriktionsenzymanalyse

30 Virusisolate stammten aus positiven Rückstellproben von Tieren der Familie *Testudinidae*, die in den Jahren 1997-2003 in Form von Organ- oder Tupferproben oder als vollständiger Tierkörper zur Abklärung der Krankheits- bzw. Todesursache in das Staatliche Veterinäruntersuchungsamt Detmold eingesandt wurden.

Bei den Tieren waren Symptome aufgetreten, die eine virale Infektion, insbesondere eine Infektion mit Herpesviren, wahrscheinlich machten.

Bei den Krankheitsanzeichen handelte es sich vor allem um Stomatitiden, Rhinitiden sowie ungeklärte Todesfälle.

Bei allen Tieren wurde das Herpesvirus anhand eines typischen cpE, den das Probenmaterial in der TH-Zellkultur hervorrief, nachgewiesen und die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

5 Virusisolate wurden ursprünglich von anderen Personen isoliert und für weitere Untersuchungen zur Verfügung gestellt.

Spezies, Herkunft der Isolate und Art der Rückstellproben, aus denen das Virusisolat gewonnen wurde, sind in Tab. 2 aufgelistet.

Tab. 2: Untersuchte Tiere, Spezies, Herkunft und Probe, aus der das Isolat gewonnen wurde

Isolat-Nr.	Spezies	Deutsche Bezeichnung	Herkunft des Isolates	Gewinnung d. Isolates¹
V17/96	<i>T. graeca</i>	Maurische Landschildkröte	MATHES (2004)	
V770/95	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	
1432/94	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen Landschildkröte	BIERMANN (1995)	Le
2245/92	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	BIERMANN (1995)	
4295/7R/95	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	MARSCHANG (2000)	R
1301/B99R/97	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	MARSCHANG (2000)	R
V17823/97	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V21308/97	<i>T. hermanni</i>	Griechisch Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V31479/97	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Organprobe
V7127/98	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V7313/98	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Organprobe
V7392/98	<i>Manouria emys emys</i>	Asiatische braune Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V7406/98	<i>T. hermanni boettgeri</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V7503/98	<i>T. graeca</i>	Maurische Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V7736/98	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V8437/98	<i>Geochelone pardalis</i>	Pantherschildkröte	SVUA Detmold	R
V8464/98	<i>Geochelone pardalis</i>	Pantherschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V8465/98	<i>Geochelone pardalis</i>	Pantherschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V120/99	<i>T. graeca</i>	Maurische Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V503/99	<i>T. graeca</i>	Maurische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V694/99	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V1114/99	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu

V1568/99	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Organprobe
V1572/99	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V1576/99	<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V1577/99	<i>T. graeca</i>	Maurische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V1579/99	<i>T. graeca</i>	Maurische Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V3494/99	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V3577/99	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	Zu
V3950/99	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	R
B/02	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V320/02	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V1261/02	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V1262/02	<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	SVUA Detmold	R
V10/03	<i>T. carbonaria</i>	Köhlerschildkröte	SVUA Detmold	ZU

¹Gewinnung des Isolates: Le = Leber; R = Rachentupfer; Zu = Zunge; Organprobe = Mischung aus mehreren Organen

Probenmaterial für die PCR

Das Probenmaterial für die PCR bestand aus den oben genannten 35 Herpesvirus-Isolaten, deren DNA aus infizierten Zellkulturen gewonnen wurde. Außerdem wurden 67 Organ- und 7 Rachentupferproben, die von 26 dieser Tiere stammten, mittels PCR auf Herpesvirus-DNA untersucht. In Tab. 3 sind die Isolat-Nr. und die Art der Proben, die untersucht wurden, aufgelistet.

Tab. 3: Organ- und Rachentupferproben

Isolat-Nr.	Probenmaterial	
V17823/97	Zu, Lu, Le	
V21308/97	Zu, Le	
V31479/97	Organprobe	
V7127/98	Zu, Le, Da	
V7313/98	Organprobe	
V7392/98	R	
V7406/98	Ge, Zu, Lu, He, Ni, Le, Foll, Ut	
V7503/98	R	
V7736/98	Ge, Zu, Lu, Le, Ni, Foll	
V8464/98	Ge, Lu, Le, Da	
V8465/98	Zu, Lu, Le, Ni, Da	
V120/99	R	
V503/99	Zu, Le, Ni, Da	Organprobe = Mischung aus mehreren Organen Da = Darm Foll = Follikel Ge = Gehirn He = Herz Kehlk = Kehlkopf Le = Leber Lu = Lunge Ni = Niere R = Rachentupfer Trach = Trachea Ut = Uterus Zu = Zunge
V694/99	Ge, Zu, Trach, Lu, Le, Ni	
V1114/99	Zu, Lu, Da	
V1568/99	Organprobe	
V1572/99	Zu, Kehlk, Trach, Lu	
V1576/99	Zu, Kehlk, Trach, Lu	
V1577/99	Zu, Kehlk, Trach, Lu	
V1579/99	Zu, Lu	
V3494/99	Zu, Trach, Lu	
B/02	R	
V320/02	R	
V1261/02	R	
V1262/02	R	
V10/03	Zu, Lu, Le	

Zusätzlich wurden zur Überprüfung der Spezifität der Primer noch weitere Herpesvirus-Isolate, welche von anderen Tierarten stammten, ein Reovirus, ein Iridovirus, ein Paramyxovirus, ein Chlamydien- und ein Mykoplasmen-Isolat in der PCR eingesetzt. Herkunft dieser Isolate siehe Tab. 4.

Probenmaterial für die Serumneutralisationstests

49 Serumproben von fünf verschiedenen Landschildkröten-Spezies, die vorberichtlich an einer Herpesvirose erkrankt waren oder aus einem Bestand mit Herpesvirose stammten, wurden in Serumneutralisationstests auf Antikörper gegen das Herpesvirus getestet. Als Antigen wurden drei von den oben genannten Virusisolaten von Landschildkröten eingesetzt, die sich im Restriktionsmuster deutlich unterschieden hatten. Es handelte sich dabei um die Isolate V770/95 (Restriktionsgruppe I), V31479/97 (Restriktionsgruppe II) und 1432/94 (Restriktionsgruppe

III). Spezies und Anzahl der Proben, von denen die Serumproben stammten, sind in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 4: Isolate für die Spezifitätsprüfung

Krankheitserreger	Isolat-Nr.	Spezies	Herkunft	Diagnose
Suid Herpesvirus 1 (SHV-1)		Schwein	SVUA Detmold	FAT, ZK
Bovines Herpesvirus 1 (BHV-1)	Schönböken	Rind	SVUA Detmold	FAT, ZK
Equines Herpesvirus 1 (EHV-1)	Stamm Austria IV	Pferd	BfA für Viruskrankheiten der Tiere, Riems	ZK, ELMI
Equines Herpesvirus 4 (EHV-4)	Stamm T 473	Pferd	BfA für Viruskrankheiten der Tiere, Riems	ZK, ELMI
Iridovirus	V1708/00	Chamäleon (<i>Chameleo quadricornis</i>)	SVUA Detmold	ZK, ELMI
Reovirus	V592/02	Geschmückter Dornschwanz (<i>Uromastyx ocellata</i>)	SVUA Detmold	ZK, ELMI
<i>Chlamydophila psittaci</i>	OODC5	aviärer Ursprung	BgVV Jena	ZK
<i>Mycoplasma agassizii</i>	PS6	Wüstenschildkröte (<i>Gopherus agassizii</i>)	University of Florida, Gainesville	ZK, Sequenzierung
Paramyxovirus	5688/91	Kornnatter (<i>Elaphe guttata</i>)	BLAHAK (1994)	ELMI

Tab. 5: Untersuchte Serumproben, Spezies und Anzahl

Spezies	Deutsche Bezeichnung	Anzahl
<i>Agr. horsfieldii</i>	Vierzehenschildkröte	21
<i>T. marginata</i>	Breitrandschildkröte	5
<i>T. hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	10
<i>T. graeca</i>	Maurische Landschildkröte	12
<i>G. denticulata</i>	Waldschildkröte	1
Summe		49

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung und Subkultivierung von Zellkulturen

Die THZ-Kulturen wurden in MEM-Anzuchtmedium mit 20 % fetalem Kälberserum bei einer Temperatur von 28 °C gehalten.

Vor der Subkultivierung wurden die Zellkulturen zunächst einer mikroskopischen Prüfung unterzogen. Überprüft wurde die Zellmorphologie und gegebenenfalls das

Vorhandensein von erkennbaren Bakterien, Hefen oder Schimmelpilzen. Der Überstand wurde abgossen und der Zellrasen mit PBS gespült.

Zur Ablösung der Zellen wurde der Zellrasen mit PBS-Versen-Trypsin-Lösung bedeckt und nach 5 min. geerntet und bei 1000 U/min für 5 min. zentrifugiert.

Der Bodensatz wurde in 3 ml MEM-Anzuchtmedium mit 20 % fetalem Kälberserum aufgenommen, gut gemischt, in 200 ml MEM-Anzuchtmedium suspendiert und in Zellkulturgefäße gegeben.

3.2.2 Anzuchtung, Passagierung und Portionierung der Isolate

Virussuspensionen, die aus Organmaterial der Sektionstiere gewonnen wurden:

Die Organe wurden einzeln entnommen, mit sterilem Seesand angerieben und mit MEM 1:5 verdünnt. Anschließend wurde das angeriebene Material in 12 ml Zentrifugenröhrchen gefüllt, 5 min mit Ultraschall behandelt und danach 5 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem Glasfaserfilter und einem Einmalfilter mit einer Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

Virussuspensionen, die aus Rachentupfern gewonnen wurden:

Rachentupfer wurden mit ca. 1-2 ml MEM versetzt, 5 min mit Ultraschall behandelt, 30 min. bei 3000 U/min zentrifugiert und der Überstand ebenfalls filtriert.

Ein Teil des Überstandes wurde für den Herpesvirus-Nachweis durch PCR und als Rückstellprobe bei -80 °C eingefroren.

Für alle nachfolgenden Charakterisierungen wurden sowohl die Virussuspensionen, die aus Organmaterial als auch die Suspensionen, die aus Rachentupfern gewonnen wurden, folgendermaßen kultiviert:

Eine 24-Loch-Kulturplatte, welche mit 1 ml Zellsuspension gefüllt wurde, wurde mit je 0,5 ml Virussuspension verimpft und bei 28 °C 7 Tage in einem CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Platte wurde jeden Tag mit einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung untersucht. Ziel der Untersuchung war die Feststellung einer Entstehung von cpEs, die die Vermehrung des Virus in der Zellkultur anzeigen.

Eine Passagierung erfolgte, indem die Viruspartikel durch Einfrieren der Kulturplatte bei -80 °C aus den Zellen freigesetzt wurden, von dieser Suspension wiederum

0,5 ml pro Loch auf eine frisch angesetzte Kulturplatte gegeben wurden und diese wieder 7 Tage inkubiert wurde.

Je nach Viruskonzentration der Suspension waren eine bis mehrere Passagen notwendig, bis der ganze Zellrasen von einem cpE betroffen war. Dann wurden die Viruspartikel wiederum durch Einfrieren freigesetzt und in eine 40 ml-Zellkulturflasche mit konfluentem THZ-Monolayer passagiert. Nachdem auch hier der gesamte Zellrasen von einem deutlichen cpE durchsetzt war, wurde auch hier der Inhalt nochmals in eine 600 ml-Zellkulturflasche passagiert und nach weiteren 7 Tagen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C eingefroren.

3.2.3 Endpunkttitrationen

Zur Reinigung der Isolate wurden vor jeder weiteren Charakterisierung zwei Endpunkttitrationen durchgeführt.

Der Virusstamm wurde bei -80 °C über Nacht eingefroren, aufgetaut und bei 2000 U/min 5 min zentrifugiert.

Der Überstand wurde in Zehnerpotenzen mit MEM in Potenzen von 10^{-1} - 10^{-10} verdünnt.

Die Titrationen erfolgten in 96-Loch-Mikrotiterplatten, in die zunächst 25 µl MEM vorgegeben wurden. Aus den Verdünnungen wurden pro Verdünnungsstufe in 4 Vertiefungen jeweils 25 µl Virussuspension zugegeben. Dann erfolgte eine Zugabe von 50 µl TH Zellsuspension und eine Inkubation der Virusstämme im CO₂ - Begasungsbrutschrank bei 28 °C.

Die Kulturen wurden täglich bei einer 100-fachen Vergrößerung mit Hilfe eines Lichtmikroskops auf das Vorkommen typischer zytopathischer Effekte untersucht. Die höchste Verdünnungsstufe, bei der nach zehn Tagen nur ein herdförmiger cpE auftrat, wurde geerntet und nach der zweiten Endpunkttitration als Ausgangsmaterial für alle weiteren Charakterisierungen genommen.

3.2.4 Neutralisationstest

Das Serum wurde 30 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. In eine 96-Loch-Mikrotiterplatte wurden pro Vertiefung 25 µl MEM gegeben.

Von dem Serum wurde eine 2er-Verdünnungsreihe bis zu einer Verdünnung von 1:512 angelegt (pro Verdünnungsstufe und eingesetztem Virusantigen 2 Vertiefungen).

100 KID₅₀ der Virusgebrauchssuspension wurden hinzugegeben und eine Stunde bei 28 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Die Ermittlung der KID₅₀ erfolgte zuvor mit der Berechnungsformel nach Spearman und Kaerber (MAYR et al., 1977).

Anschließend wurden 50 µl frisch subkultivierte TH-Zellsuspension hinzugefügt. Zusätzlich wurde eine Serumkontrolle, eine Zellkontrolle und eine Viruskontrolle in Form der Virusgebrauchslösung in einer Verdünnungsreihe in Zehnerpotenzen bis 10⁻³ mitgeführt.

Die Auswertung erfolgte nach 6 Tagen unter dem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung, wobei beurteilt wurde, ob eine Virusvermehrung, sichtbar durch einen cpE, stattgefunden hatte. Wurde eine Virusvermehrung durch die im Serum enthaltenen virusneutralisierenden Antikörper verhindert, in der Antigenkontrolle jedoch nicht, war die spezifische Neutralisation nachgewiesen. Als Antikörpertiter eines Serums galt jene höchste Serumverdünnung, bei der kein cpE sichtbar ist. Die Bestimmung der Antikörpertiter wurde nach der vereinfachten Labormethode zur Berechnung des Antikörpertiters nach Reed und Munch durchgeführt (MAYR et al., 1977). Als Spezifitätsgrenze wurde ein Titer von ≤ 8 gewählt. Dieser Wert wurde von anderen Autoren übernommen (MARSCHANG et al., 2001b; BLAHAK, persönliche Mitteilung).

3.2.5 Chloroform-Resistenztest

Der Chloroform-Resistenztest dient zur Unterscheidung von Viren mit Lipidhülle und unbehüllten Viren.

Behüllte Viren werden durch die Chloroformbehandlung zerstört, während unbehüllte Viren infektiös bleiben und in der Zellkultur einen cpE hervorrufen.

Zu diesem Zweck wurden 0,9 ml virushaltiger Zellüberstand mit 0,1 ml Chloroform versetzt, eine Stunde bei 4 °C geschüttelt und über Nacht bei 4 °C gekühlt. Dann erfolgte eine Abtrennung des Chloroforms durch 20minütige Zentrifugation (2000 U/min). Dadurch bildeten sich zwei Phasen: die wässrige obere Schicht enthielt das Virus ohne Hülle, die untere das Chloroform mit den lipidhaltigen Anteilen der

Viren. Die obere wässrige Phase wird im Verhältnis 1:20 mit MEM verdünnt und auf ausgewachsene THZ-Kulturen inokuliert.

Als Kontrollansatz wurde virushaltiger Zellüberstand ohne Chloroformansatz der gleichen Behandlung unterworfen.

Beide Ansätze wurden 10 Tage lang mittels Lichtmikroskop auf einen cpE kontrolliert.

3.2.6 Virusvermehrung in Anwesenheit von 5-Iod-2-Desoxy-Uridin (IUDR)

IUDR hemmt die Replikation von DNA-Viren, indem es bei der Synthese der Desoxyribonukleinsäure anstelle von Pyridin eingebaut wird und so zum Abbruch der Synthese führt. Da dieser Effekt bei RNA-Viren nicht eintritt, eignet sich IUDR zur Bestimmung des Nukleinsäure-Typs.

Ausgewachsene TH-Zellkulturen in 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden mit 50 µl virushaltigem Überstand beimpft, welcher in Potenzen von 10^0 - 10^{10} mit MEM verdünnt worden war und 2 h bei 28 °C inkubiert.

Das Inokulat wurde abgesaugt und je 2 Vertiefungen der gleichen Verdünnungsstufe wurden mit MEM und je 2 Vertiefungen wurden mit MEM und IUDR aufgefüllt.

Die Konzentration des IUDR in der Stammlösung betrug 1mg/ml, die Konzentration im Medium über den okulierten Zellkulturen betrug 50 µl/ml.

Der Ansatz wurde täglich für einen Zeitraum von 10 Tagen auf das Auftreten eines cpE untersucht.

3.2.7 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Für die elektronenmikroskopische Virusdarstellung wurden 25 ml virushaltiger Zellkulturüberstand an das Staatliche Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg gesandt und dort von Herrn Dr. Dieter Prager elektronenmikroskopisch untersucht.

3.2.8 Extraktion, Reinigung und Anreicherung viraler DNA

Durch die nachfolgenden Schritte wurden

- a) Zellmembranen aufgebrochen
- b) alle Bestandteile außer der DNA entfernt
- c) die DNA-Suspension konzentriert

Ausgangsmaterial

- 200 µl Virussuspension, gewonnen aus Organmaterial der Sektionstiere
- 200 µl Virussuspension, gewonnen aus Rachentupferproben
- 200 µl Sediment bzw. Überstand aus virushaltiger Zellkultur einer 600 ml Zellkulturflasche. Das Sediment wurde in 200 µl MEM resuspendiert.

Die Extraktion der viralen DNA erfolgte mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule des DNA-Extraktionskits NucleoSpin Tissue® von Machery-Nagel nach folgendem Protokoll:

Lysis:

180 µl Lysispuffer T1 und 25 µl Proteinase K wurden zu 200 µl der Probensuspension, sowie zu der Negativ- und Positivkontrolle in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben und bei 56 °C 3 h inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 200 µl B3 hinzugefügt, gemischt und wiederum 10 min bei 70 °C inkubiert.

DNA-Fällung und –Bindung:

Durch Hinzufügen von 210 µl Ethanol (96 %) wurde die DNA gefällt. Anschließend wurde die gesamte Probe gemischt und in die NucleoSpin® Säule überführt, die sich in einem 2 ml Zentrifugen-Auffanggefäß befand.

Anschließend fand eine Zentrifugation für 1 min bei 14000 U/min (11000 x g) statt, bei welcher die DNA an eine in der Säule befindliche Silikat-Membran gebunden wurde.

Waschschritte:

Die NucleoSpin Tissue® Säule wurde in eine neues Auffanggefäß gesteckt und 500 ml BW hinzugeben.

Wiederum wurde für 1 min bei 14000 U zentrifugiert, die NucleoSpin® Säule in eine neues Auffanggefäß umgesteckt und 600 ml B5 hinzugeben.

Nach einminütiger Zentrifugation wurde die Säule nochmals umgesteckt und nochmals zentrifugiert.

Trocknungsschritt:

Zur Entfernung des Restalkohols wurde nochmals bei 14000 U/min zentrifugiert.

Elution der DNA:

Die Säule wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gesetzt und 100 µl auf 70 °C erwärmter Elutionspuffer BE hinzugeben. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die DNA durch Zentrifugation bei 14000 U/min eluiert.

Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C oder bei längerer Lagerung bei -20 °C.

3.2.9 DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen und Einteilung in Gruppen anhand des Spaltmusters

Es wurden die drei Restriktionsendonukleasen BamH I, Hind III und Sal I mit den vom Hersteller mitgelieferten Puffern verwendet.

Für die Spaltung wurde DNA eingesetzt, die aus dem Zellsediment von ca. 50 ml virushaltiger Zellkultur gewonnen wurde.

Um Spaltmuster zu erhalten, die in der Reinheit der DNA und der Intensität der Bandenmuster vergleichbare Ergebnisse lieferten, wurde in einem Vorversuch mit der Restriktionsendonuklease BamH I zunächst ein einheitlicher Spaltansatz mit einem Volumen von 20 µl, bestehend aus 2 µl Enzympuffer (10-fach konzentriert), 1 µl Restriktionsendonuklease, 8 µl DNA-Lösung und 9 µl Aqua bidest. gewählt. Nach optischer Beurteilung des Ergebnisses wurde die Menge der DNA-Lösung im entgeltigen Spaltansatz entsprechend variiert und mit Aqua bidest. auf 20 µl aufgefüllt. In einem Spaltansatz wurde statt Virus-DNA-Lösung, DNA-Lösung aus nichtinfizierter Zellkultur-DNA eingesetzt. Anschließend fand eine 3-stündige Inkubation im Blockthermostat bei 37 °C statt.

Zum Gießen eines ca. 0,5 cm dicken 0,7 % Gels wurden 1,75 g Agarose in 250 ml TAE (1-fach konzentrierte Arbeitslösung) in einem Mikrowellengerät bis zum Sie-

den solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig aufgelöst hatte. Anschließend wurde die Lösung auf ca. 65 °C abgekühlt, damit es beim Gießen des Gels zu keiner Verformung des Geltablets kam.

Das Gel wurde auf ein UV transparentes 20 x 20 x 1,5 cm großes Geltablett der Gelelektrophoresekammer aufgegossen. Nach der Erstarrung wurde die Kammer mit TAE-Arbeitspuffer gefüllt, bis das Gel ca. 1 mm bedeckt war.

Die Spaltansätze wurden zusammen mit 3 µl Auftragepuffer in die Geltaschen gegeben. Die in dem Auftragepuffer enthaltene Saccharose stoppt die Spaltreaktion und erhöht das spezifische Gewicht der Lösung, so dass die Probe in die Geltasche sinkt. Das enthaltene Bromphenolblau dient als Farbmarker der Markierung der Lauffront. Bei jeder Gelelektrophorese wurden zusätzlich 2 unterschiedliche DNA-Marker als Referenzmaterial zur Bestimmung der Fragmentgröße mitgeführt. Außerdem wurde ein Elektrophoreselauf durchgeführt, in dem Virus-DNA mitgeführt wurde, die nicht durch Restriktionsendonukleasen verdaut worden war.

Die Dauer des Elektrophoreselaufes betrug 14,5 h.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel 20 min in einer Ethidiumbromid-Lösung gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in das DNA-Molekül und lässt es im UV-Licht sichtbar werden. Zur Digitalphotographie im UV-Licht wurde das Gel bei einer Belichtungszeit von 1,5-3 sec fotografiert und über einen angeschlossenen Thermoprinter in schwarz-weiß ausgedruckt. Die digitalisierten Fotos wurden auf der Festplatte und auf CD gespeichert und archiviert.

Eine Einteilung der Isolate in Gruppen wurde anhand von übereinstimmenden Fragmenten durchgeführt. Für die jeweilige Gruppe wurden Banden ausgewählt, die bei mindestens 80 % der Isolate vorhanden waren. Bei diesen Banden wurde eine Abschätzung der Anzahl der Basenpaare durchgeführt. Dazu wurde mit Hilfe der Photos der Spaltpattern die Laufstrecke der DNA-Marker-Fragmente in cm ermittelt. Diese Werte wurden zusammen mit der Angabe der Basenpaar-Anzahl im Computerprogramm Microsoft Excel in ein Koordinatensystem eingegeben. Auf der x-Achse befindet sich die Skala für die Anzahl der Basenpaare, auf der y-Achse die Skala für die Laufstrecke in cm. Diese Werte wurden durch interpolierte Linien zu einer Referenzkurve verbunden, auf der die Fragmentgröße der Isolate nach Bestimmung deren Laufstrecke abgeschätzt werden konnte.

Von allen Photos wurde per Hand eine schematische Darstellung der Fragmentmuster erstellt und die übereinstimmenden Banden rot markiert.

3.2.10 Polymerase chain reaction (PCR)

Alle ausgeführten PCRs wurden mit einem Reaktionsvolumen von 50 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde durch Veränderung verschiedener Parameter (MgCl₂- und Primer-Konzentration, Annealingtemperatur) optimiert. Die Zusammenstellung des Reaktionsansatzes (Mastermix), dessen Portionierung und die Zugabe der aufgearbeiteten Proben (Template) fand auf Eis statt. Dadurch wurde die Bildung von Primerdimeren vermieden. Zum Ausgleich von Pipettierverlusten wurde die Menge der Reaktionskomponenten immer um 5-10 % größer gewählt, als für den jeweiligen Ansatz benötigt wurde.

Zum Nachweis von Landschildkröten-pathogener Herpesvirus-DNA kamen sowohl Primer zur Anwendung, welche spezifisch für dieses spezielle Herpesvirus sind (PCR1 mit Primern nach TEIFKE et al. (2000) und PCR2 mit Primern nach MURAKAMI et al. (2001)), als auch eine PCR, deren Spezifität sich auf einen großen Teil der Familie der Herpesviren erstreckt (PCR3 mit Primern nach VAN DEVANTER et al. (1996)). Primersequenzen siehe Tab. 6.

Tab. 6: Primer-Sequenzen

Primer	Sequenz (5'-3')	Größe des Amplifikates	Autoren
R2 F2	TCATTCCGTTATACATGAGCG TGGTTGGACAACAACATGGC	307 bp	TEIFKE et al. (2000)
U-73 L-588 U-289	AGGCGGGAAAGGATTATGTC AGTTTGATAGGGGATTTGAA GATTTACTGGCGTGGCTATG	535 bp* 319 bp**	MURAKAMI et al. (2001)
DFA ILK KG1 TGV IYG	GAYTTYGCNAGYYTNTAYCC TCCTGGACAAGCAGCARNYSGCNMTNAA GTCTTGCTCACCAGNTCNACNCCYTT TGTAACTCGGTGTAYGGNTTYACNGGNGT CACAGAGTCCGTRTCNCCRTADAT	234 bp**	VAN DEVANTER et al. (1996)
Y=T/C, N=A/G/T/C; R=A/G, S=G/C, M=A/C, *Amplifikat der Primary PCR, **Amplifikat der Secondary PCR			

3.2.10.1 Spezifische PCR für den Nachweis von Landschildkröten-pathogenem Herpesvirus (PCR1 und PCR2)

Für die PCR1 kamen die Primer R2 und F2 nach TEIFKE et al. (2000) zur Anwendung. Amplifiziert wurde ein Abschnitt des hochkonservierten UL5-Gens.

In der PCR2 nach MURAKAMI et al. (2001) wurde in einer teilverschachtelten (heminested) PCR ein Abschnitt des hochkonservierten herpesviralen DNA-Polymerase-Gens vervielfältigt. Dazu kamen in der ersten PCR (Primary PCR2) die Primer U-73 und L-588 zur Anwendung. In der zweiten PCR (Secondary PCR2) wurde das Produkt der ersten PCR als Substrat für die Primer U-289 und L-588 verwendet.

Reaktionsbedingungen und Reaktionsansatz siehe Tab. 7-10.

Tab. 7: Reaktionsbedingungen PCR1

Reaktionsschritt*	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	95 °C	3 min
2. Denaturierung	95 °C	30 sec
3. Annealing	46 °C	30 sec
4. Elongation	72 °C	30 sec
5. Finale Elongation	72 °C	10 min

*Schritt 2. - 4.: 35 Zyklen

Tab. 8: Reaktionsansatz PCR1

Reaktions-Komponenten	Menge (µl)	Konzentration
Polymerasepuffer (10x) + 15 mM MgCl ₂ *	5,0 µl	1x Polymerasepuffer + 1,5 mM MgCl ₂
10 mM dNTPs (1:10)	4,0 µl	je 200 µM jedes Nukleotids
Primer F2 (1:10)	1,25 µl	0,25 µM
Primer R2 (1:10)	1,25 µl	0,25 µM
25 mM MgCl ₂ *	1 µl	
RNase/DNase-free water	32,25 µl	
Taq DNA Polymerase	0,25 µl	1,25 U
DNA	5,0 µl	
Gesamtvolumen 50,0 µl		*MgCl ₂ -Gesamtkonzentration: 1,75mM

Tab. 9: Reaktionsbedingungen PCR2

Primary PCR2		
Reaktionsschritt*	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
2. Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Annealing	50 °C	1 min
4. Elongation	72 °C	1 min
5. Finale Elongation	72 °C	10 min
*Schritt 2.-4.: 35 Zyklen		
Secondary PCR2		
Reaktionsschritt*	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	94 °C	3 min
2. Denaturierung	94 °C	30 sec
3. Annealing	51 °C	1 min
4. Elongation	72 °C	1 min
5. Finale Elongation	72 °C	10 min
*Schritt 2.-4.: 20 Zyklen		

Tab. 10: Reaktionsansatz PCR2

	Reaktionskomponenten	Menge (µl)	Konzentration
Primary PCR	Polymerasepuffer (10x) + 15 mM MgCl ₂	5,0 µl	1x Polymerasepuffer + 1,5 mM MgCl ₂
	10 mM dNTPs (1:10)	4,0 µl	je 200 µM jedes Nukleotids
	Primer U-73	1,0 µl	0,2 µM
	Primer L-588	1,0 µl	0,2 µM
	RNase/DNase-free water	36,7 µl	
	Taq DNA Polymerase	0,3 µl	1,5 U
	DNA	2,0 µl	
Gesamtvolumen 50 µl			
Secondary PCR	Polymerasepuffer (10x) + 15 mM MgCl ₂	5,0 µl	1x Polymerasepuffer + 1,5 mM MgCl ₂
	10 mM dNTPs (1:10)	4,0 µl	je 200 µM jedes Nukleotids
	Primer U-289	1,0 µl	0,2 µM
	Primer L-588	1,0 µl	0,2 µM
	RNase/DNase-free water	38,2 µl	
	Taq DNA Polymerase	0,3 µl	1,5 U
	Produkt der Primary PCR	0,5 µl	
Gesamtvolumen 50 µl			

3.2.10.2 Spezifische PCR für die Familie Herpesviridae (PCR3)

Es wurden die degenerierten Primer DFA, ILK, KG1, TGV und IYG nach VAN DE-VANTER et al. (1996) mit einer Spezifität für eine hochkonservierte Region der herpesviralen DNA-Polymerase im verschachtelten (nested) Verfahren eingesetzt. Die erste PCR (Primary PCR3) wurde in einem Multiplex-Verfahren mit drei Primern (DFA, ILK und KG1) durchgeführt. Für die zweite PCR (Secondary PCR3) wurde das Produkt der Primary PCR als Substrat für die Primer TGV und IYG verwendet. Da über die Größe des DNA-Amplifikates noch keine genauen Anga-

ben existieren, wurde das DNA-Produkt in das SVUA Arnsberg gesandt und dort freundlicherweise von Herrn Dr. Kilwinski mit Hilfe des ABI Prism® Systems sequenziert.

Reaktionsbedingungen und Reaktionsansatz siehe Tab. 11 und 12.

Tab. 11: Reaktionsbedingungen PCR3

Primary und Secondary PCR3		
Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	94 °C	30 sec
2. Annealing	43 °C	1 min
3. Elongation	72 °C	1 min
4. Finale Elongation	72 °C	7 min
Schritt 1.-3.: 44 Zyklen		

Tab. 12: Reaktionsansatz PCR3

	Reaktionskomponenten	Menge (µl)	Konzentration
Primary PCR	Polymerasepuffer (10x) + 15 mM MgCl ₂	5,0 µl	1x Polymerasepuffer + 1,5 mM MgCl ₂
	10 mM dNTPs (1:10)	4,0 µl	je 200 µM jedes Nukleotids
	Primer DFA	4,0 µl	0,8 µM
	Primer ILK	4,0 µl	0,8 µM
	Primer KG1	4,0 µl	0,8 µM
	RNase/DNase-free water	26,75 µl	
	Taq DNA Polymerase	0,25 µl	1,25 U
	DNA	2 µl	
Gesamtvolumen 50 µl			
Secondary PCR	Polymerasepuffer (10x) + 15 mM MgCl ₂	5,0 µl	1x Polymerasepuffer + 1,5 mM MgCl ₂
	10 mM dNTPs (1:10)	4,0 µl	je 200 µl jedes Nukleotids
	Primer TGV	5,0 µl	1,0 µM
	Primer IYG	5,0 µl	1,0 µM
	RNase/DNase-free water	28,75 µl	
	Taq DNA Polymerase	0,25 µl	1,25 U
	Produkt der Primary PCR	2,0 µl	
	Gesamtvolumen 50 µl		

3.2.10.3 PCR-Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA aus infizierten Zellkulturen

Eine Anzuchtung der zweimalig austitrierten Virusisolate auf TH-Zellkultur und die DNA-Extraktion erfolgte wie unter 3.2.2 und 3.2.8 beschrieben. Die eingesetzte DNA-Menge variierte je nach PCR-Protokoll.

Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle, welche bei der DNA-Extraktion alle Reaktionsschritte durchlaufen hatte, mitgeführt.

3.2.10.4 PCR-Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA aus Organmaterial

Eine DNA-Extraktion erfolgte aus Suspensionen der Organ- und Tupferproben, wie unter 3.2.8 beschrieben. Die Menge an eingesetzter DNA variierte je nach PCR-Protokoll.

Bei jeder PCR wurde eine Negativkontrolle, welche bei der DNA-Extraktion alle Reaktionsschritte durchlaufen hatte, sowie eine Positivkontrolle in Form eines Landschildkröten-Herpesvirusisolates, welches aus TH-Zellkultur gewonnen wurde, mitgeführt.

3.2.10.5 Untersuchungen zur Spezifität der PCR

Um die Spezifität der PCR zu testen, wurde die zuvor extrahierte DNA von Herpesviren anderer Tierarten, Viren anderer Virusfamilien, ein Chlamydien-, und ein Mykoplasmen-Isolat und Überstand aus nicht infizierten TH-Zellkulturen unter den genannten Reaktionsbedingungen untersucht.

3.2.11 Gelelektrophorese

10 µl jedes PCR-Produktes wurde zusammen mit 2 µl Auftragepuffer auf ein horizontales 1,7% Agarosegel aufgetragen. Der Elektrophoreselauf erfolgte bei 110 V bei variablem mA Wert für 90 min. Eine DNA-Marker wurde zusammen mit Negativ- und Positiv-Kontrollen bei jedem Lauf mitgeführt.

Eine Sichtbarmachung der Amplifikate erfolgt durch Färbung für 3 min in Ethidiumbromid und wurde nach einer Entfärbezeit von 45 min auf dieselbe Weise sichtbar gemacht und archiviert wie bei der DNA-Spaltung durch Restriktionsendonukleasen beschrieben.

4 Ergebnisse

4.1 Vorbericht, klinische Befunde und Ergebnisse der weiterführenden Untersuchungen

Alle Virusisolate stammen von Schildkröten, die entweder als vollständiger Tierkörper oder als Organ- oder Rachentupferproben zur Abklärung der Krankheits- bzw. Todesursache in das Staatliche Veterinäruntersuchungsamt Detmold eingewandt wurden.

Bei den Tierkörpern fand eine Sektion mit histologischer, bakteriologischer und virologischer Untersuchung statt. Organ- und Rachentupferproben wurden zunächst nur virologisch mittels TH-Zellkultur untersucht.

Das Isolat V17/96 wurde freundlicherweise von Frau Dr. K.A. Mathes zur Verfügung gestellt. Es handelte sich um eine gestorbene *T. graeca* aus einer Auffangstation für Schildkröten in Frankreich, bei der pathologisch-anatomisch Stomatitis, Ösophagitis und Tracheitis festgestellt wurden. Histologisch wurden in Zunge, Ösophagus und Trachea intranukleäre Einschlusskörperchen festgestellt (MATHES, 2004).

Das Isolat V770/95 stammte von einer *T. hermanni* und wurde im SVUA Detmold isoliert.

Die Isolate 2245/92 und 1432/94 stammten aus dem Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen. Alle Befunde wurden im Rahmen einer Dissertation von BIERMANN (1995) erhoben.

Isolat 2245/92 stammt von einer *T. hermanni*, welche im Frühsommer an Inappetenz und Speichelfluss, sowie im Rachenraum an weißlich borkigen Auflagerungen litt. Eine im Frühjahr erworbene und ohne Quarantäne in den Bestand gesetzte weitere *T. hermanni* zeigte ähnliche Symptome.

Tier 1432/94 war eine *Agr. horsfieldii*, die mit Dyspnoe, und dicken gelben Belägen auf der Zunge verendete.

Bei der Sektion fanden sich bei beiden Tieren eine massive Stomatitis, Pharyngitis und Tracheitis zusammen mit einer Fettleber und atrophischen Nieren. Bei 2245/92 wurde zusätzlich Aszitis und Pneumonie und bei 1432/94 vermehrter Schleim im Magen-Darm-Trakt festgestellt. Histologisch fanden sich bei beiden Tieren intranukleäre Einschlusskörperchen im Maul- und Rachenbereich, bei 1432/94 zudem in der Leber.

Die Isolate 4295/7R/95 und 1301/B99R/97 wurden freundlicherweise von Frau Dr. R.E. Marschang zur Verfügung gestellt.

Virusisolat 4295/7R/95 wurde aus einer Tupferprobe einer symptomlosen *T. hermanni* isoliert, die aus einem Bestand mit 21 *T. hermanni* und zwei *T. graeca* stammte. Nachdem im Mai eine aufgefundene *T. graeca* in den Bestand gesetzt worden war, erkrankten im September einige *T. hermanni* an Stomatitis und Rhinitis mit Augen- und Nasenausfluss, verbunden mit nekrotischen Zungenläsionen und Anorexie. Keine der *T. graeca* zeigte Krankheitsanzeichen (MARSCHANG, 2000).

Bei Tier 1301/B99R/97 handelte es sich um eine mit Stomatitis gestorbene *Agr. horsfieldii*. Bei der Sektion zeigte sich eine diphtheroid-nekrotisierende Stomatitis, Ösophagitis, und Tracheitis, sowie eine Pneumonie und Hepatitis. Histologisch wurden intranukleäre Einschlusskörperchen in Leber, Eileiter und Trachea gefunden. Eine ebenfalls in dem Bestand vorhandene *T. hermanni* starb unter ähnliche Krankheitsanzeichen (MARSCHANG, 2000).

V17823/97 starb plötzlich einen Monat nach der Winterruhe. Es handelte sich um eine männliche, 2,5 Jahre alte *T. hermanni*, welche zuvor keinerlei Symptome gezeigt hatte.

Der Besitzer hatte ein Jahr zuvor Jungtiere der Spezies *T. hermanni* zugekauft, von denen ein Tier sofort starb und zwei weitere kümmernten. Auch bei später zugesetzten Tieren der selben Spezies traten Krankheits- und Todesfälle auf.

Der Tierkörper kam in autolytischem Zustand zur Untersuchung.

Auf Zungen- und Ösophagusschleimhaut fanden sich geringgradige Beläge, die Milz war leicht geschwollen und in der dilatierten Harnblase fand sich viel Harnries.

Das Tier war hochgradig mit Oxyuren befallen.

Tier V21308/97 war eine juvenile *T. hermanni* aus dem selben Bestand wie V17823/97.

Bei der Sektion wurde eine massive diphtheroid-nekrotisierende Stomatitis und Pharyngitis festgestellt.

Leber und Niere waren hyperämisch und in der Leber wurden *Aeromonas sp.* festgestellt.

Bei Tier V31479/97 handelte es sich um eine *T. hermanni*, von welcher Organproben zur virologischen Untersuchung eingesandt wurden.

Bei einer weiteren *T. hermanni* desselben Bestandes, von der ebenfalls Organproben zugesandt wurden, konnten keine Herpesviren isoliert werden.

Bei dem Tier V7127/98 handelte es sich um eine weibliche adulte *T. hermanni hermanni*, die zusammen mit 5 weiteren *T. hermanni hermanni* und weiteren *T. graeca iberica* in einem Freilandgehege lebte. Daneben besitzt der Halter weitere *T. hermanni* in anderen Gehegen. Laut Besitzerangabe handelt es sich bei den Tieren größtenteils um Wildfänge. Vor zwei Jahren hatte der Besitzer eine *T. graeca iberica* in die Gruppe integriert, ansonsten hatten die Tiere keinen weiteren Kontakt zu anderen Landschildkröten.

Alle *T. hermanni* dieses Geheges erkrankten zwischen März und April 1998 im Anschluss an die Winterruhe. Symptome waren Lethargie, seröser Nasenausfluss und gelbe Beläge in der Mundhöhle.

5 Tiere verstarben nach wenigen Tagen, eine Schildkröte hatte die Erkrankung nach 14 Tagen überwunden und ist seitdem (Mai 2003) nicht mehr erkrankt.

Keine *T. graeca* und keine Schildkröte aus den anderen Gehegen erkrankte.

Der Tierkörper wurde vollständig und in frischem Zustand eingesandt.

Bei der Sektion fanden sich massive eitrige Beläge auf der Zunge. Die Leber war geschwollen und von gelblicher Farbe. Im Blinddarm-Enddarm Bereich fand sich eine fibrinöse Entzündung mit deutlicher Gefäßzeichnung.

Histologisch wurde in der Zunge eine hochgradig mit Bakterien infizierte Schleimhautnekrose mit Epitheldesquamation diagnostiziert, und es fanden sich zahlreiche rötlich-bläuliche intranukleäre Einschlusskörperchen.

Im Dünndarm hatte eine Epitheldesquamation stattgefunden und im Enddarm fanden sich hochgradige Fibrinbeläge.

In der Leber wurde eine hochgradige diffuse Leberdystrophie und bei der Niere eine mittelgradige Tubulusnephrose festgestellt.

Bakteriologisch konnten aus Leber und Herz *Vibrio alginolyticus* isoliert werden.

Von V7313/98 lagen Organproben zusammen mit Organproben eines weiteren Tieres des selben Besitzers zur virologischen Untersuchung vor.

Es handelte sich um zwei *T. hermanni*, welche nach Symptomen, wie Rhinitis und Unruhe gestorben waren.

Nur bei V7313/98 konnten Herpesviren isoliert werden.

Bei V7392/98 handelte es sich um eine weibliche, *adulte Manouria emys emys*, die 2 Monate vor Krankheitsbeginn als Wildfang erworben wurde.

Das Tier zeigte verminderten Appetit, klaren Augen- und schleimigen, kleinblasigen Nasenausfluss, Salivation, Atemnot und zentralnervöse Symptome, wie Ataxie und Drehen um die eigene Achse.

Trotz Behandlung mit Chloramphenicol und Enrofloxacin starb die Schildkröte nach fünf Tagen.

Aus einer Rachentupferprobe konnten Herpesviren isoliert werden, wogegen bei einer zusätzlich eingesandten Serumprobe keine Antikörper gegen Herpesviren festgestellt werden konnten.

V7406/98 stammte aus einem Bestand, in dem ausschließlich *T. hermanni boettgeri* vorhanden waren.

Von dem Tier wurden Organproben und zwei Eier zur virologischen Untersuchung eingesandt. Ebenfalls eingesandt wurden Eier von weiteren Tieren des Bestandes. Nur aus Zunge und Gehirn konnten Herpesviren isoliert werden, während Verimpfungen von Leber, Herz, Lunge, Gebärmutter, Follikel und Eier in der Zellkultur keinen cpE hervorriefen.

Von der Schildkröte V7503/98 gelangten ein Rachentupfer und ein Tupfer vom Lebergewebe zur virologischen Untersuchung. Zusätzlich wurde Serum zur Testung auf Antikörper gegen Herpesviren eingesandt.

Es handelte sich um eine weibliche *T. graeca graeca*, die zusammen mit weiteren Tieren der selben Spezies in einem Freilandgehege gehalten wurde. Bei schlechter Witterung erfolgte ein Umsetzen in ein Zimmerterrarium.

Die Tiere waren vor einem Jahr erworben worden, wobei zwei Tiere schnell starben. Das vorliegende Tier zeigte ein Siechtum über Monate in Form von verminderter Futteraufnahme, verbunden mit zunehmendem Gewichtsverlust, Apathie, intermittierendem klarem Nasenausfluss und Absatz von weißlichem Kot, der eine große Menge unverdaute Nahrungspartikel enthielt.

Eine vom behandelnden Tierarzt durchgeführte Sektion erbrachte einen Ulkus im rechten Mundwinkel, eine miliare Lebernekrose und vereinzelt Oxyuren im Dickdarm.

Weitere Untersuchungen wurden nicht vorgenommen. Serologisch wurden keine Herpesvirus-Antikörper festgestellt. Auch aus dem Tupfer vom Lebergewebe konnte kein Herpesvirus isoliert werden, während der Rachentupfer viruspositiv war.

Bei V7736/98 handelte es sich um eine weibliche adulte *T. hermanni*, welche zur Feststellung der Todesursache eingesandt wurde.

Der Tierkörper war frisch und in reduziertem Ernährungszustand.

Bei der Sektion fanden sich helle Beläge auf der Zunge, verbunden mit einer Ansammlung von viel Schleim in der Rachenhöhle.

In der Leber wurden histologisch umschriebene Pyknoseherde mit lymphozytärer perifokaler Infiltration festgestellt.

Die Tiere V8437/98, V8464/98 und V8465/98 stammten aus einem Bestand. Es handelt sich um 2 weibliche (V8437/98 und V8465/98) und eine männliche (V8464/98), adulte *Geochelone pardalis*, von welchen Organproben zur virologischen Untersuchung eingesendet wurden.

Vorberichtlich lag bei dem Tier V8437/98 pathologisch-anatomisch eine Entzündung der Mundhöhle mit mehrere mm starken diphtheroiden Belägen und eine Leberdegeneration vor.

Elektronenmikroskopisch waren Herpesvirus-ähnliche Partikel nachgewiesen worden.

Eine zusätzlich eingesandte Blutprobe dieses Tieres wurde im SVUA Detmold auf Antikörper gegen Herpesviren untersucht. Diese Untersuchung verlief negativ.

Bei Tier V120/99 handelte es sich um eine ca. 4 Jahre alte *T. graeca*, welche im Jahr 1998 zusammen mit einer weiteren *T. graeca* als Nachzuchttiere erworben und zu einer sich schon länger in Besitz befindlichen *T. hermanni* gesetzt wurden.

Gehalten wurden die Tiere in einem Terrarium mit seltenem Freilandaufenthalt.

Nach gemeinsamer Überwinterung zeigten beide *T. graeca* weißlichen Ausfluss aus Nase und Maul, die *T. hermanni* war anorektisch.

Beide *T. graeca* starben nach wenigen Tagen, die *T. hermanni* überlebte bis Ende des Jahres 1999 – der weitere Verlauf ist unbekannt.

Von allen drei Tieren wurden Rachentupferproben virologisch untersucht. Nur von dem Tier V120/99 konnte ein Herpesvirus isoliert werden.

Tier V503/99 war eine ca. 18 jährige, weibliche *T. graeca graeca* aus einem, 11 Tiere umfassenden, aus *T. graeca* und *T. hermanni* bestehenden Bestand. Die Tiere wurden im Freilandgehege gehalten.

2 Wochen nachdem die Besitzerin eine Landschildkröte unbekannter Spezies in Pflege genommen hatte, erkrankten nacheinander alle *T. graeca* und einige *T. hermanni* an Atemnot, schleimigen Speichelfluss und Schluckbeschwerden. Die Symptome zogen sich teilweise über Monate hin, wobei nur einige *T. hermanni* überlebten.

Tier V503/99 wurde in gefrorenem Zustand zur Untersuchung eingesandt.

Bei der Sektion fanden sich schleimige Beläge in der Mundhöhle. Die Leber war deutlich geschwollen und gelblich verfärbt, in der Niere wurden *Vibrio sp.* gefunden.

Bei dem Tier V694/99 handelte es sich um eine weibliche, juvenile *Agr. horsfieldii*, welche zusammen mit einer Gruppe von ca. 150 Tieren derselben Spezies aus Russland importiert wurde.

Etwa 2/3 der Tiere erkrankten nach dem Import an Symptomen, wie nekrotisierende Stomatitis, Dyspnoe und Kehlgangödem und verendeten akut.

Die Schildkröte wurde vollständig und in frischem Zustand zur Untersuchung eingesandt.

Bei der Sektion wurden massive, gelbe, festhaftende Beläge auf Zunge und Rachenschleimhaut gefunden. Die Leber erwies sich als geringgradig gelblich verfärbt.

Bakteriologisch wurden aus Niere und Herz *Pseudomonas sp.* und aus der Niere zusätzlich *Streptococcus sp.* isoliert.

V1114/99, V1568/99 und V1572/99 stammten aus einem Bestand, in dem *T. hermanni boettgeri*, *T. graeca iberica* und *T. marginata* lebten.

Vor vier Jahren brach nach der Winterruhe eine Herpesvirusepidemie unter den *T. hermanni* aus.

Zwei Tiere überlebten und entwickelten serologisch messbare Antikörper.

Bei dem erneuten Herpesvirus-Ausbruch vier Jahr später zeigten diese Tiere keine Symptome und auch ihre nach dem ersten Ausbruch geborenen Jungtiere waren symptomlos.

V1114/99 war eine weibliche, adulte *T. hermanni*, welche nach dem Winterschlaf ein schlechtes Allgemeinbefinden und Beläge im Maul, gefolgt von einem plötzlichen Exitus zeigte.

Aus der zur virologischen Untersuchung eingesandten Organprobe konnten Herpesviren isoliert werden.

Bei V1568/99 handelte es sich um eine adulte *T. hermanni*. Auch hier traten nach der Winterruhe ein schlechtes Allgemeinbefinden, Beläge im Maul und ein plötzlicher Exitus auf.

Eine zwei Wochen vorher untersuchte Serumprobe dieses Tieres war Antikörpernegativ.

Auch bei dieser Schildkröte konnten aus den eingesandten Organproben Herpesviren isoliert werden.

V1572/99 war eine adulte männliche *T. hermanni* mit den selben Befunden wie V1114/99 und V1568/99.

V1576/99 und V1577/99 stammten von Organproben einer *T. hermanni*, bzw. einer *T. graeca* aus einem Bestand mit drei *T. graeca* und zwei *T. hermanni*.

Die Infektion erfolgte vermutlich durch ein zugekauftes Tier, welches kurz nach dem Kauf starb.

Alle Tiere zeigten Atemwegssymptome, wie Dyspnoe, Polypnoe und Schnappatmung, sowie weiße Beläge im Maul.

Von den übrigen erkrankten Tieren wurden Serumproben eingeschickt, die jedoch keine messbaren Antikörper gegen Herpesviren enthielten.

Bei V1579/99 handelte es sich um eine weibliche, juvenile *T. graeca*, welche zur Abklärung der Todesursache eingesandt wurde.

Der Tierkörper war frisch und in einem guten Ernährungszustand.

Bei der Sektion wurden gelbe Beläge auf Zungen- und Rachenschleimhaut gefunden, die bis in den Ösophagus reichten.

Histologisch wurden neben einer tiefen, über Mukosa und Submukosa bis in die Muskularis reichenden Nekrose eine nekrotisierende Pneumonie festgestellt.

Das Gewebe beider Organe war massiv mit Kokken besiedelt, während aus Leber, Niere und Herz *Vibrio sp.* isoliert wurden.

In der Zunge fanden sich intranukleäre Einschlusskörperchen.

V3494/99 war eine semiadulte *Agr. horsfieldii*, die eine Woche vor ihrem Exitus zusammen mit einem weiteren Tier der gleichen Spezies im Zoohandel erworben worden war.

Das Tier zeigte schaumige Salivation, Beläge im Maul und hatte ein schlechtes Allgemeinbefinden. Zur Abklärung der Todesursache wurden Organproben zur virologischen Untersuchung eingeschickt.

Von dem zweiten Tier, welches keinerlei Symptome zeigte, wurden in einer Serumprobe Antikörper gegen Herpesviren nachgewiesen.

Bei V3577/99 handelte es sich um eine juvenile *Agr. horsfieldii*, welche vor kurzer Zeit zugekauft worden war.

Der Tierkörper wurde frisch und mit reduziertem Ernährungszustand zur Abklärung der Krankheitsursache eingeschickt. Von der behandelnden Tierärztin wurde der Verdacht auf eine Hypervitaminose A und eine Herpesvirose geäußert.

Bei der Sektion wurden massive, gelbe, festhaftende Beläge auf Zunge, Rachenschleimhaut und Ösophagus gefunden.

Die Leber war gelb verfärbt und geschwollen, die Milz war ebenfalls geschwollen. Im Dickdarm waren Oxyuren enthalten und die Harnblase war mit Harnries gefüllt.

Histologisch wies die Leber eine starke retikuläre Schwellung und eine Vakuolisierung der Leberzellen auf. Die Milz zeigte eine pulpöse Hyperplasie und in Trachea und Zunge wurden eine nekrotische Entzündung mit Kern-Einschlußkörperchen gefunden.

V3950/99 stammte aus einem Bestand von ca. 25 Tieren, welche die Spezies *T. hermanni boettgeri* und *Agr. horsfieldii* umfasst. Es handelt sich um eine männliche, ca. 10 Jahre alte *Agr. horsfieldii*, welche im Herbst an einer Dyspnoe litt und ein Kehlgangödem und Beläge auf der Zunge aufwies.

Die Symptome traten in zeitlichem Zusammenhang mit einem Neuzugang auf, wobei die Spezies dieses Tieres nicht zu ermitteln war.

Sowohl unter den *T. hermanni*, als auch unter den *Agr. horsfieldii* traten Krankheits- und Todesfälle auf. Überlebende Tiere gehörten nur der Art *Agr. horsfieldii* an.

Das Tier B/02 stammte aus einem Bestand mit *Agr. horsfieldii* und *T. hermanni*. Es handelte sich um eine weibliche, ca. fünf Jahre alte *Agr. horsfieldii*, die nach dem Winterschlaf Beläge in der Maulhöhle, Nasenausfluss und ein pfeifendes Atemgeräusch zeigte.

Nach Behandlung mit Antibiotika und Infusionen besserten sich die Symptome, so dass die Behandlung nach drei Wochen abgeschlossen werden konnte.

Alle anderen Tiere des Bestandes zeigten zu diesem Zeitpunkt keine Krankheitsanzeichen.

Bei V320/02 handelte es sich um die Rachentupferprobe einer männlichen *Agr. horsfieldii*, die zusammen mit 13 weiteren *Agr. horsfieldii* und 4 *T. hermanni* gehalten wurde.

Nach dem Winterschlaf zeigte das Tier Apathie, Inappetenz, Augen- und Nasenausfluss und in der Maulhöhle befand sich im rechten Pharynxbereich eine diphteroide Schleimhautveränderung.

Nach Behandlung mit Enrofloxacin und Ringer- und Glukose-Infusionen besserte sich das Allgemeinbefinden und die Symptome verschwanden nach 7 Tagen. In einer später untersuchten Serumprobe fanden sich Herpesvirus-Antikörper. Alle weiteren Tiere des Bestandes zeigten keine Krankheitsanzeichen.

Die Virusisolate V1261/02 und V1262/02 stammten von Tupferproben zweier *Agr. horsfieldii*.

Bei V10/03 handelte es sich um eine *G. carbonaria*, die zur Feststellung der Todesursache eingesandt wurde.

Der Tierkörper war frisch, der Ernährungszustand reduziert.

Die Sektion ergab eine gelblich verfärbte Leber und geringgradig vergrößerte Nieren.

Histologisch wurde eine hochgradige Fettleber festgestellt.

Mikrobiologisch fanden sich eine Reihe von Keimen in Leber und Niere (aerobe Sporenbildner, coliforme Keime, *Staphylococcus spp.*).

4.2 Charakterisierung der Virusisolate

4.2.1 Chloroformbehandlung und Kultivierung mit IUDR

Sowohl nach der Behandlung mit Chloroform, als auch bei der Kultivierung der Virusisolate mit IUDR trat in dem Beobachtungszeitraum von zehn Tagen kein cpE auf.

Dieser Verlust der Infektiosität, bzw. die verlorene Eigenschaft der Vermehrung in TH-Zellkulturen weisen auf ein behülltes DNA-Virus hin.

4.2.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Die Untersuchung von Kulturüberstand infizierter TH-Zellen im Elektronenmikroskop zeigte ikosaedrische Kapside mit einem Durchmesser von ca. 95-105 nm, die von Hüllfragmenten umgeben waren. Aufgrund der Morphologie und Größe der Partikel handelt es sich um Herpesviren. Vertreter anderer Virusfamilien wurden nicht gefunden.

4.2.3 Veränderungen der Morphologie des infizierten Zellrasens (cytopathischer Effekt/cpE)

Ca. 3 Tage nach Infektion der TH-Zellkultur zeigten sich erste Veränderungen, die das Sterben der Zellen anzeigten. Einzelne Zellen rundeten sich ab, vergrößerten sich und entwickelten sich zu Synzytien. Schließlich lösten sie sich aus dem Zellrasen, so dass sich ein typischer Plaque bildete. Die umgebenden Zellen waren zu diesem Zeitpunkt noch weitgehend unbeschädigt (Abb. 5 und 6). Nach ca. drei weiteren Tagen waren fast alle Zellen der Kultur infiziert und hatten sich von dem Boden der Zellkulturflasche gelöst.

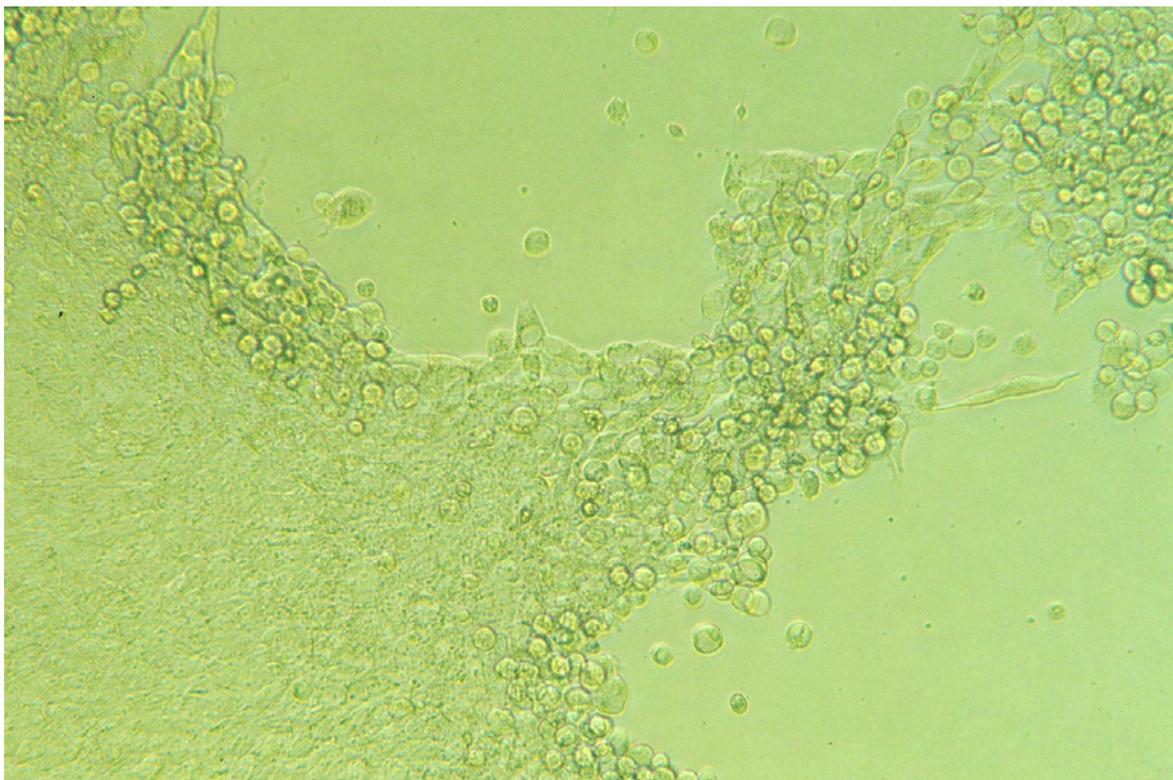


Abb. 5: TH-Zellkultur infiziert mit Virusisolat V21308/97, 4 Tage p.i. (100-fache Vergrößerung)

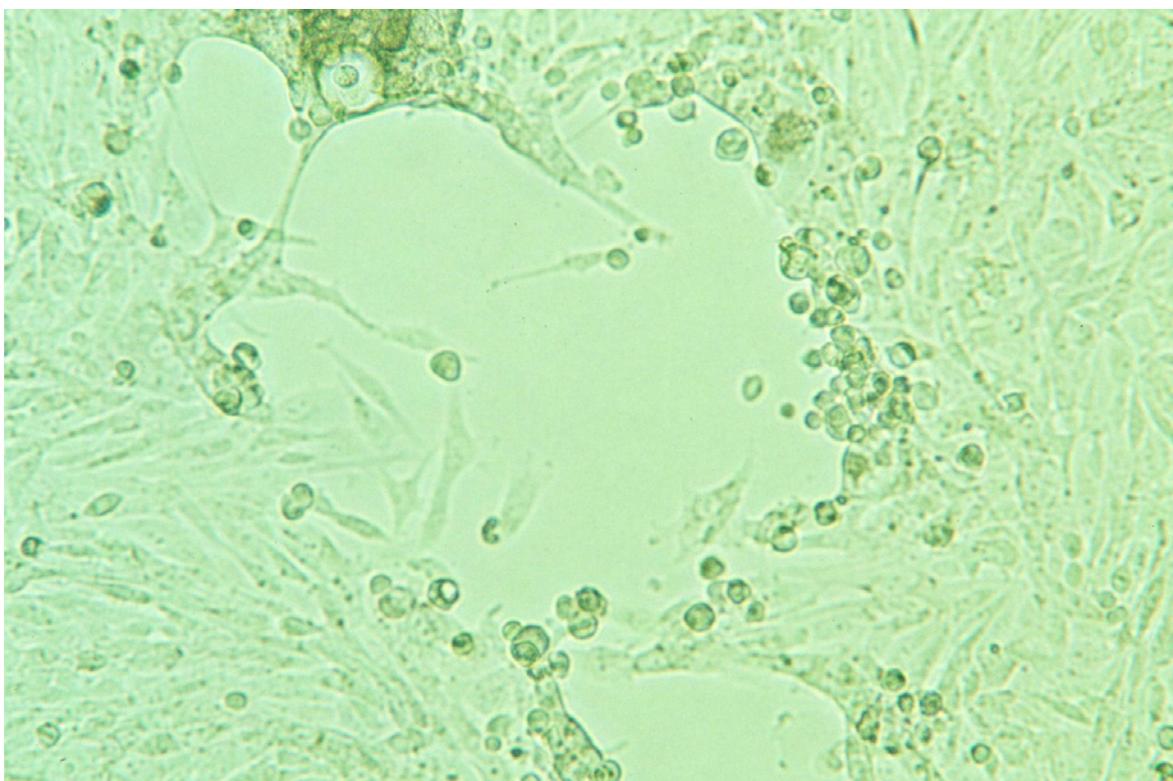


Abb. 6: TH-Zellkultur infiziert mit Virusisolat V694/99, 4 Tage p.i. (100-fache Vergrößerung)

4.3 Restriktionsendonukleasenmuster

4.3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Die DNA aller Virusisolate konnte durch die angewendeten Restriktionsendonukleasen gespalten werden und die Reproduzierbarkeit des Bandenmusters wurde durch mehrfache Wiederholungen der Spaltungen bewiesen.

Die Qualität der einzelnen Bandenmuster in Bezug auf Intensität der Banden und Sauberkeit des Hintergrundes war von der im Spaltansatz eingesetzten DNA-Menge und der im Spaltansatz vorhandenen Menge an abgebauter Zell-DNA abhängig. Die Qualität war am Besten, wenn das Virus geerntet wurde, sobald der Zellrasen fast vollständig aufgelöst war.

Ein Elektrophoreselauf, der mit Virus-DNA durchgeführt wurde, welche nicht durch Restriktionsendonukleasen verdaut wurde, ergab keine Banden. Ebenso DNA aus nicht-infizierten TH-Zellkulturen, welche mit Restriktionsendonukleasen gespalten wurde.

Da sich die Fragmente bei Virus-DNA, die aus Zellüberstand gewonnen wurde, nicht oder nur undeutlich darstellten, wurde eine DNA-Spaltung nur mit Material durchgeführt, welches aus dem Zellpellet gewonnen wurde.

Das Volumen an eingesetzter DNA-Lösung pro Restriktionsendonukleasen-Verdau schwankte zwischen 2 und 17 µl.

4.3.2 Ergebnisse der DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Die untersuchten Isolate ließen sich nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen aufgrund einer ausgewählten Anzahl übereinstimmender Spaltfragmente in drei Gruppen (Restriktionsgruppe I-III) einteilen. Die Tab. 13-15 zeigen Größenabschätzung und Anzahl der ausgewählten gemeinsamen Spaltfragmente, sowie die Fragmente, die in mehreren Restriktionsgruppen vorkamen.

Die Gruppeneinteilung war bei allen drei Restriktionsendonukleasen gleich.

Tab. 13: Gemeinsame Spaltfragmente der Restriktionsgruppe I

Restriktions- enzym	Gemeinsame Spaltfragmente	Bemerkungen
BamH I	ca. 3390 bp ca. 3900 bp ca. 4800 bp ca. 5300 bp ca. 5400 bp ca. 6380 bp ca. 7200 bp ca. 7500 bp ca. 14950 bp	fehlt bei 1579/99 auch in Restriktionsgruppe II vorhanden fehlt bei 1579/99 auch in Restriktionsgruppe II vorhanden fehlt bei 2245/92, 770/95 auch in Restriktionsgruppe II vorhanden
Hind III	ca. 2560 bp ca. 4720 bp ca. 4990 bp ca. 5410 bp ca. 6450 bp ca. 8400 bp ca. 10820 bp ca. 14900 bp	fehlt bei 7313/98, 8465/98, 1568/99, 1579/99, auch in Restriktionsgruppe II vorhanden auch in Restriktionsgruppe II vorhanden auch in Restriktionsgruppe II vorhanden fehlt bei 1576/99
Sal I	ca. 3500 bp ca. 3550 bp ca. 4450 bp ca. 5200 bp ca. 15850 bp ca. 17900 bp	fehlt bei 4295/7R/95, bei 2245/92 nicht auswertbar bei 2245/92 nicht auswertbar, fehlt bei 4295/7R/95 fehlt bei 7127/98, 1577/99

Tab. 14: Gemeinsame Spaltfragmente der Restriktionsgruppe II

Restriktions- enzym	Gemeinsame Spaltfragmente	Bemerkungen
BamH I	ca. 3220 bp ca. 3340 bp ca. 3800 bp ca. 3940 bp ca. 4280 bp ca. 5300 bp ca. 6410 bp ca. 7900 bp ca. 8800 bp ca. 11850 bp ca. 14950 bp ca. 25250 bp	auch in Restriktionsgruppe I vorhanden auch in Restriktionsgruppe I vorhanden auch in Restriktionsgruppe III vorhanden auch in Restriktionsgruppe I vorhanden
Hind III	ca. 4720 bp ca. 4990 bp ca. 6450 bp ca. 7050 bp ca. 7980 bp ca. 8350 bp ca. 10100 bp ca. 11020 bp ca. 15200 bp ca. 16400 bp	auch in Restriktionsgruppe I vorhanden auch in Restriktionsgruppe I vorhanden
Sal I	ca. 3500 bp ca. 3550 bp ca. 3650 bp ca. 4600 bp ca. 6050 bp ca. 6400 bp ca. 6600 bp ca. 7200 bp ca. 9000 bp ca. 10120 bp ca. 11850 bp ca. 12800 bp	

Tab. 15: Gemeinsame Spaltfragmente der Restriktionsgruppe III

Restriktions- enzym	Gemeinsame Spaltfragmente	Bemerkungen
BamH I	ca. 2050 bp ca. 2450 bp ca. 3110 bp ca. 3650 bp ca. 3800 bp ca. 3920 bp ca. 4750 bp ca. 5400 bp ca. 6950 bp ca. 8100 bp ca. 8400 bp ca. 10300 bp ca. 11850 bp ca. 12380 bp ca. 17900 bp	fehlt bei 3494/99, 1262/02 auch in Restriktionsgruppe I vorhanden fehlt bei 3577/99
Hind III	ca. 1780 bp ca. 1850 bp ca. 2090 bp ca. 3200 bp ca. 3920 bp ca. 4100 bp ca. 5400 bp ca. 5900 bp ca. 7250 bp ca. 9150 bp ca. 11500 bp ca. 11720 bp	fehlt bei 694/99, 1262/02 fehlt bei 694/99 fehlt bei 3950/99 fehlt bei 1432/94, 1301/B99R/97, 320/02 fehlt bei 1432/94
Sal I	ca. 2270 bp ca. 3690 bp ca. 4080 bp ca. 4400 bp ca. 7160 bp ca. 15260 bp ca. 16900 bp ca. 24200 bp	fehlt bei 694/99, 3494/99

Alle Herpesvirus-Isolate, die in Restriktionsgruppe III eingeordnet wurden, waren aus Schildkröten der Spezies *Agr. horsfieldii* isoliert worden. Tab. 16 zeigt, die Einteilung der Isolate in die drei Restriktionsgruppen.

Tab. 16: Gruppeneinteilung der Isolate nach Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsgruppe I	Restriktionsgruppe II	Restriktionsgruppe III
V17328/97	V31479/97	V694/99
V21308/97	V7392/98	V3494/99
V7127/98	V7503/98	V3577/99
V7313/98		V3950/99
V7406/98		1301/B99R/97
V7736/98		1432/94
V8437/98		V320/02
V8464/98		V1261/02
V8465/98		V1262/02
V120/99		B/02
V503/99		
V1114/99		
V1568/99		
V1572/99		
V1576/99		
V1577/99		
V1579/99		
V10/03		
V17/96		
V770/95		
V2245/92		
4295/7R/95		

Die Fragmentgrößen lagen bei Restriktionsgruppe I zwischen >1000 und ca. 14700 bp (BamH I), ca. 14900 bp (Hind III) und ca. 17900 bp (Sal I). Bei Restriktionsgruppe II lagen sie zwischen > 1000 und ca. 25250 bp (BamH I), ca. 16400 bp (Hind III) und ca. 16500 bzw. 12800 bp (Isolat 31479/97) (Sal I). Bei Restriktionsgruppe III lagen sie zwischen > 1000 und ca. 17900 bzw. 24900 bp (Isolat V3577/99) (BamH I), ca. 11720 bzw. 13300 bp (Isolat 1301/B99R/97) (Hind III) und ca. 24200 bp (Sal I).

Tab. 17 gibt die Speziesverteilung innerhalb der drei Restriktionsgruppen an.

Tab. 17: Speziesverteilung innerhalb der Restriktionsgruppen

Restriktionsgruppe I	Restriktionsgruppe II	Restriktionsgruppe III
<i>T. hermanni</i> : 13 Tiere <i>T. graeca</i> : 5 Tiere <i>G. pardalis</i> : 3 Tiere <i>G. carbonaria</i> : 1 Tier	<i>T. hermanni</i> : 1 Tier <i>T. graeca</i> : 1 Tier <i>M. emys emys</i> : 1 Tier	<i>Agr. horsfieldii</i> : 10 Tiere

4.3.2.1 Fotografische und schematische Darstellung der Restriktionsmuster

Die Abb. 7-66 stellen Fotos und schematische Darstellungen der Bandenmuster der gespaltenen DNA dar.

Die Isolate der Restriktionsgruppe I, gespalten mit BamH I:

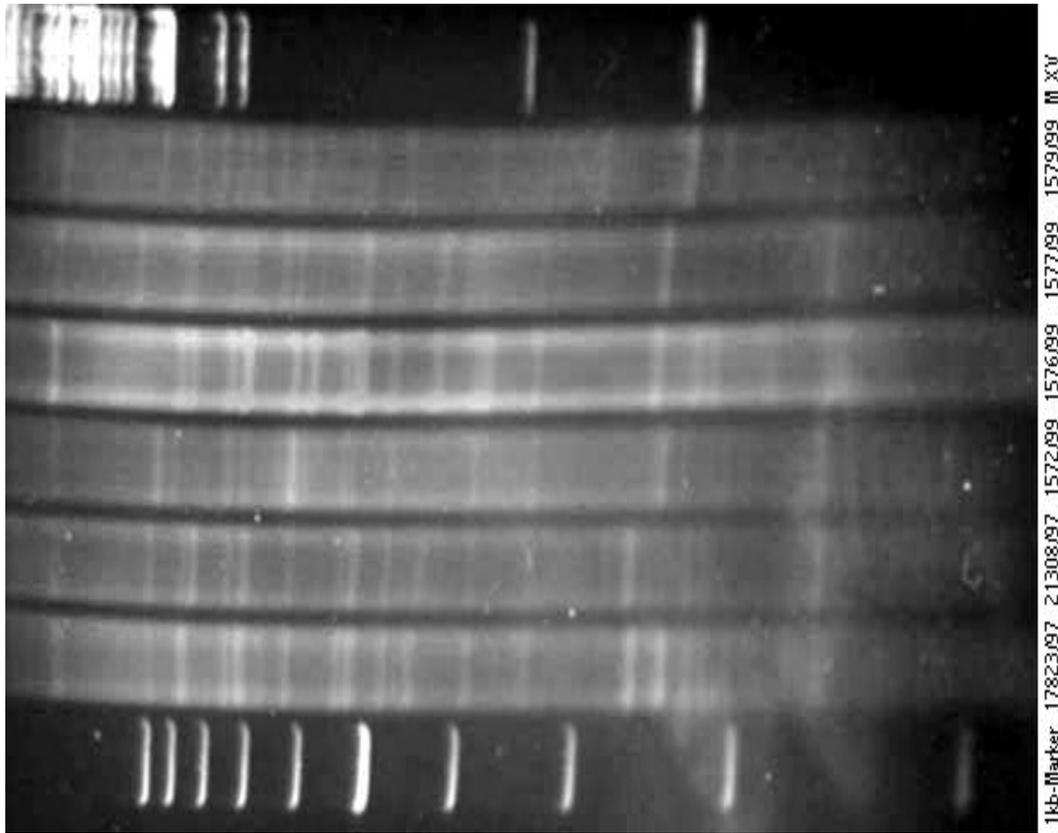


Abb. 7: Herpesvirus-DNA gespalten mit BamH I, Spur 1 und 8: DNA-Marker

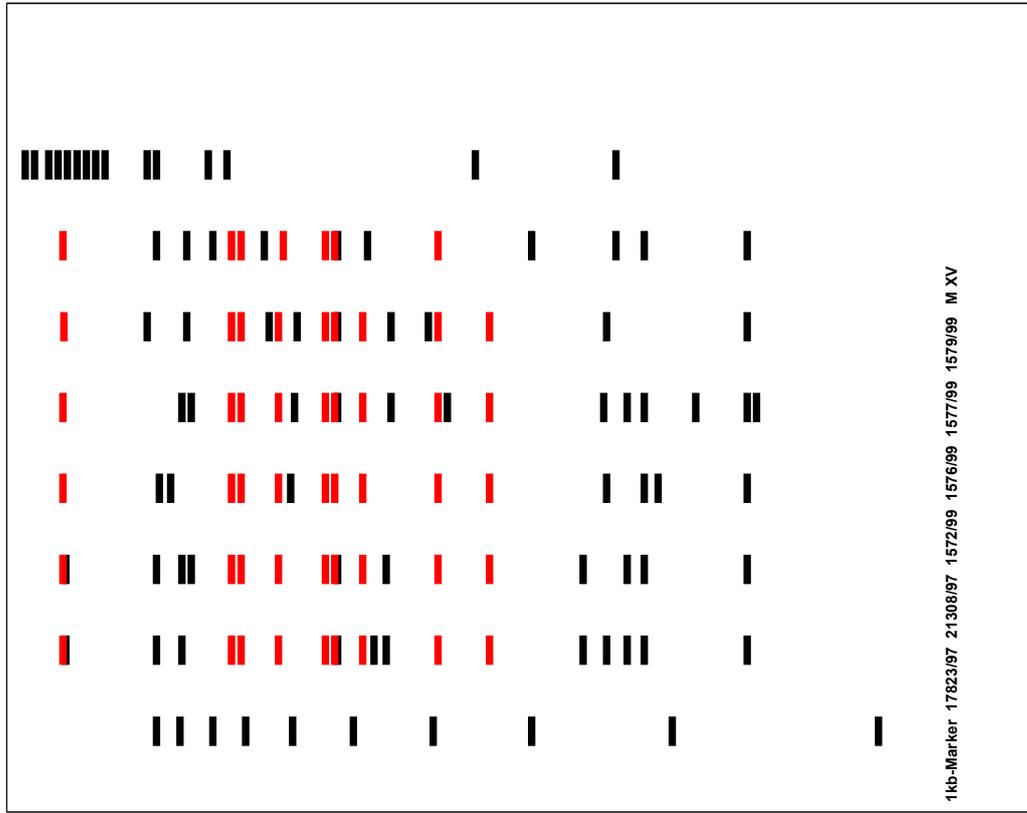


Abb. 8: Schematische Darstellung von Abb. 7

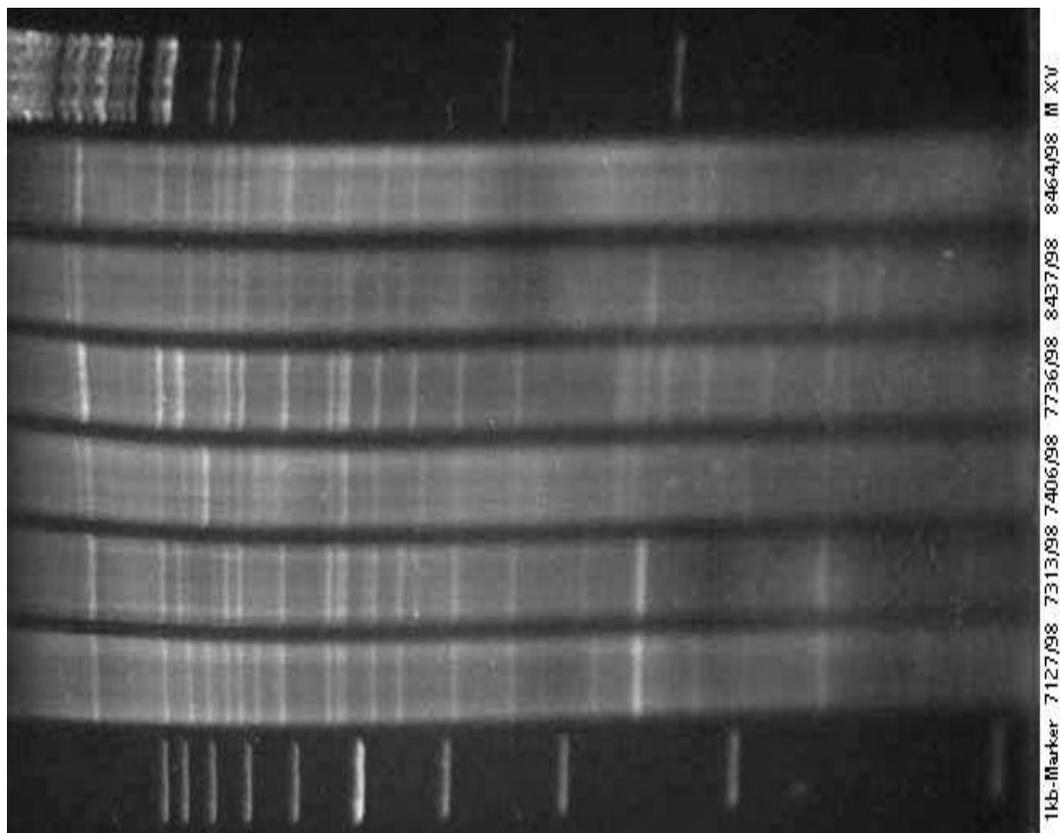


Abb. 9: Herpesvirus-DNA gespalten mit BamH I, Spur 1 und 8: DNA-Marker

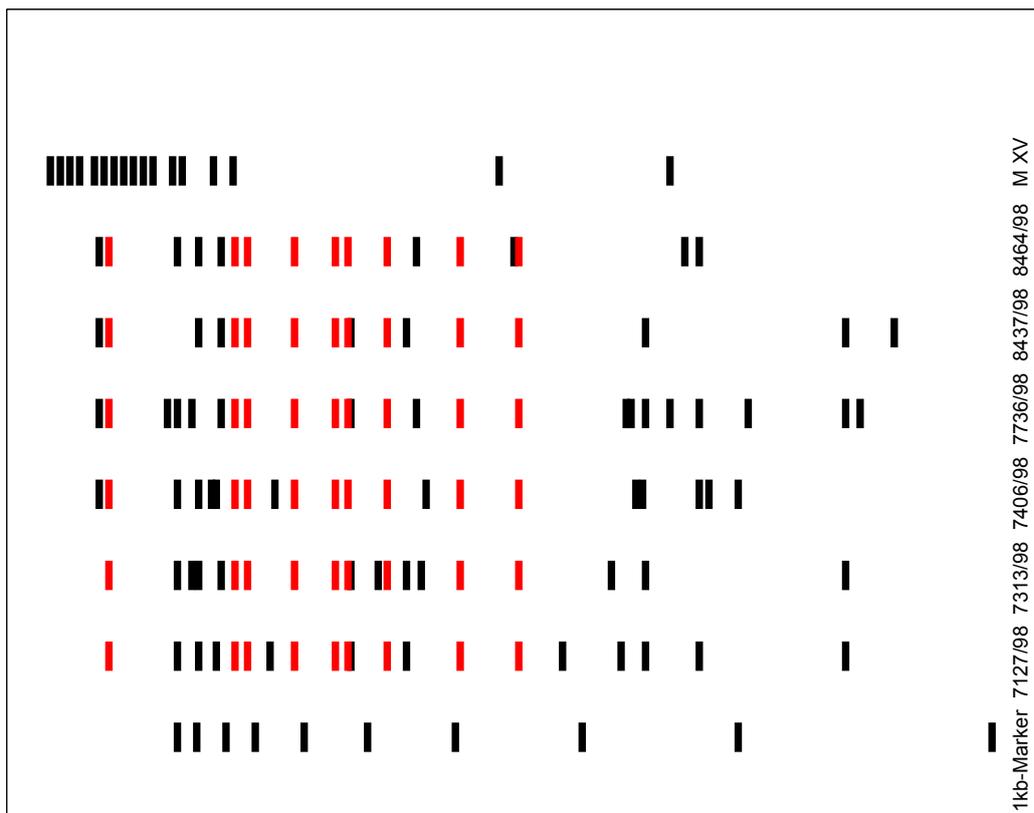


Abb. 10: Schematische Darstellung von Abb. 9

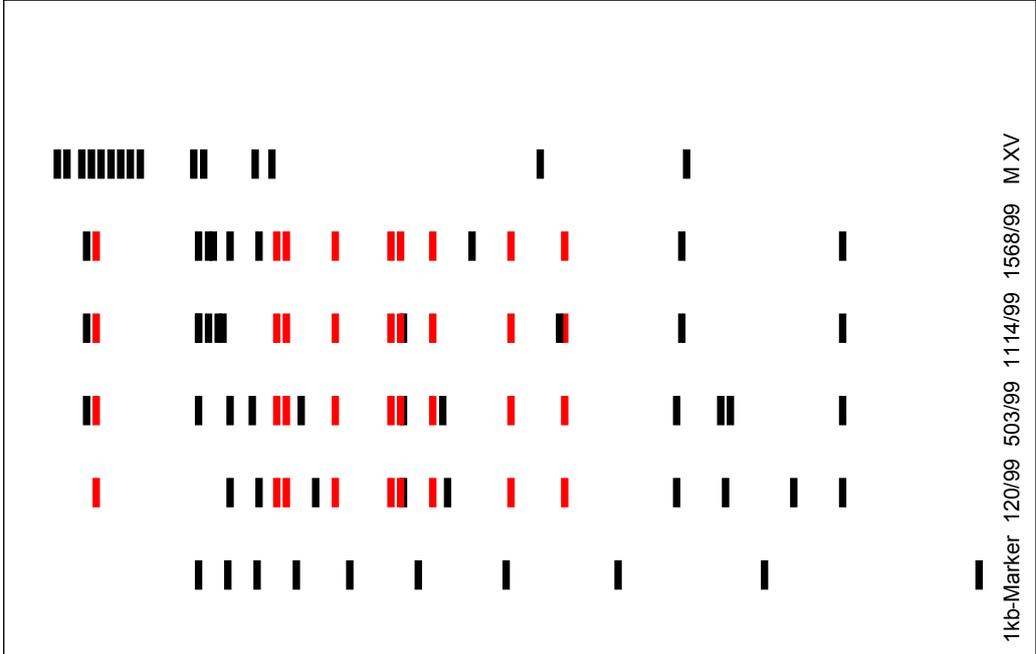


Abb. 12: Schematische Darstellung von Abb. 11

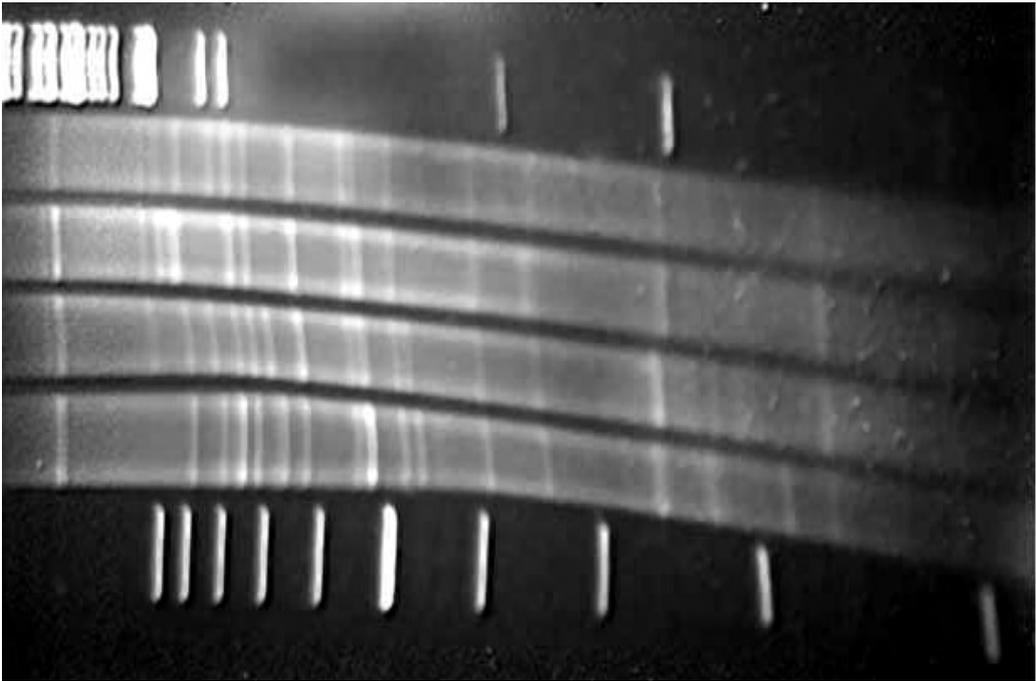


Abb. 11: Herpesvirus-DNA, gespalten mit BamH I, Spur 1 und 6: DNA-Marker

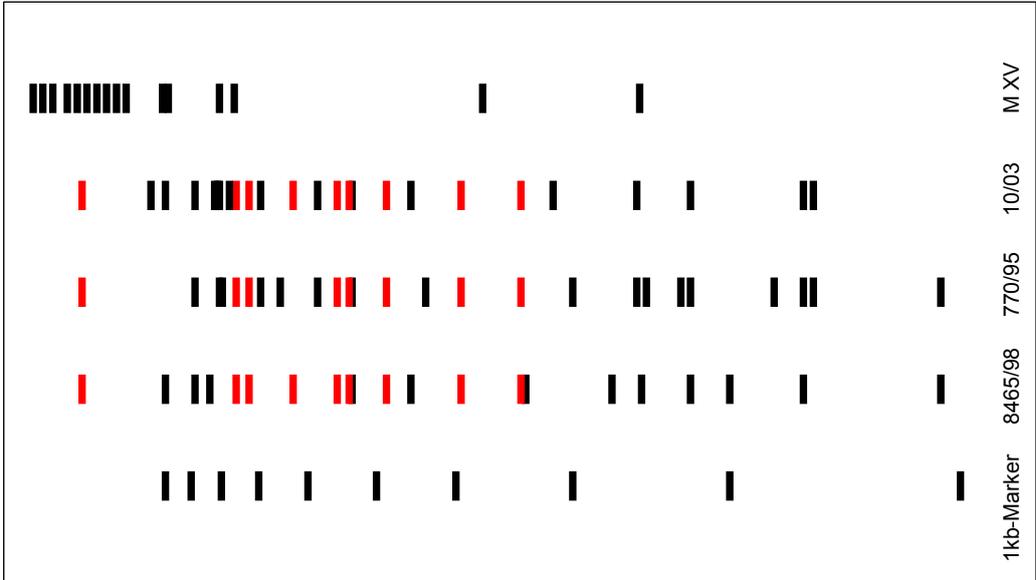


Abb. 14: Schematische Darstellung von Abb. 13

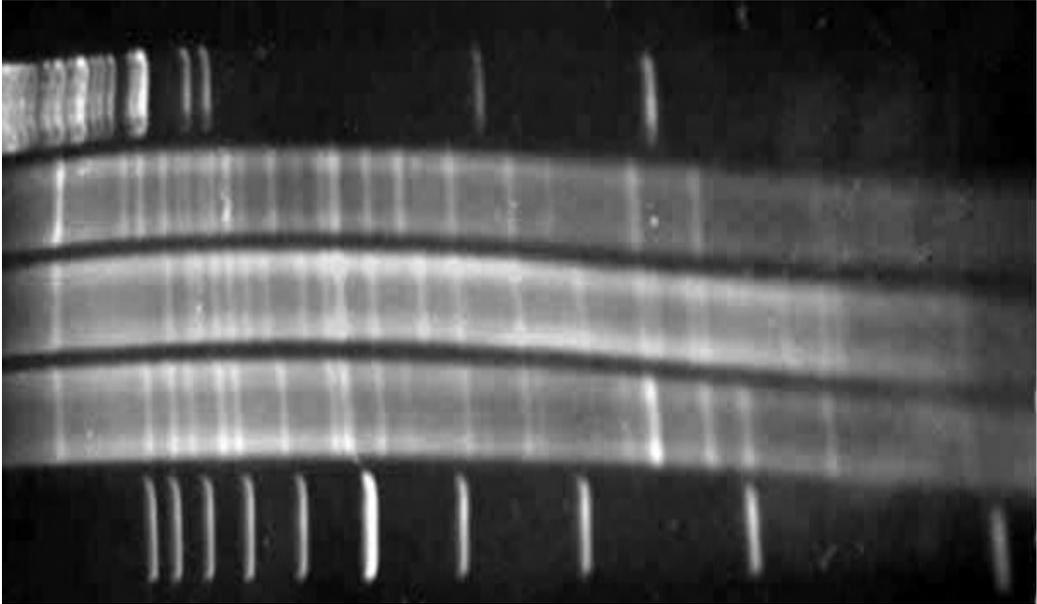


Abb. 13: Herpesvirus-DNA, gespalten mit BamH I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

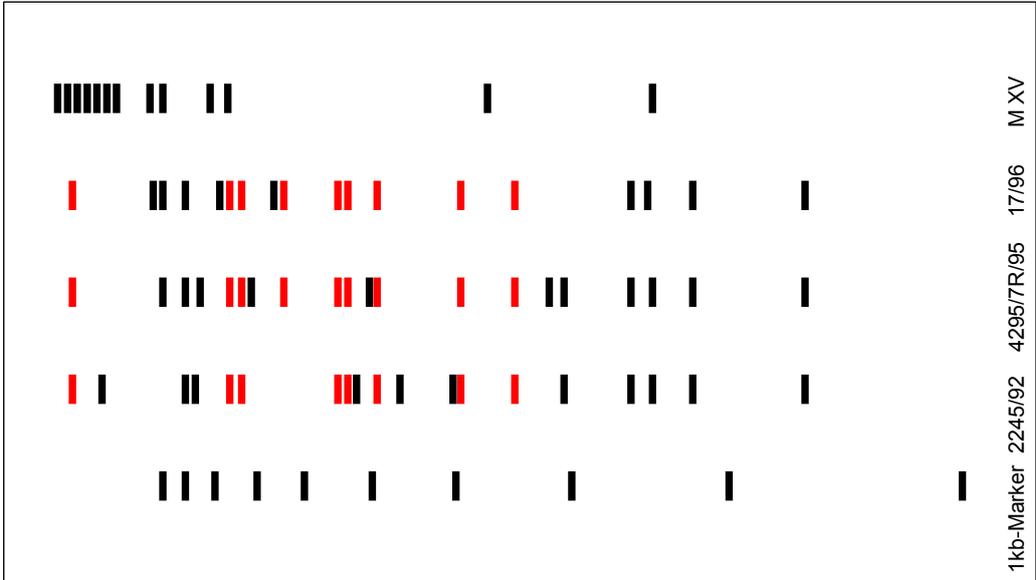


Abb. 16: Schematische Darstellung von Abb. 15

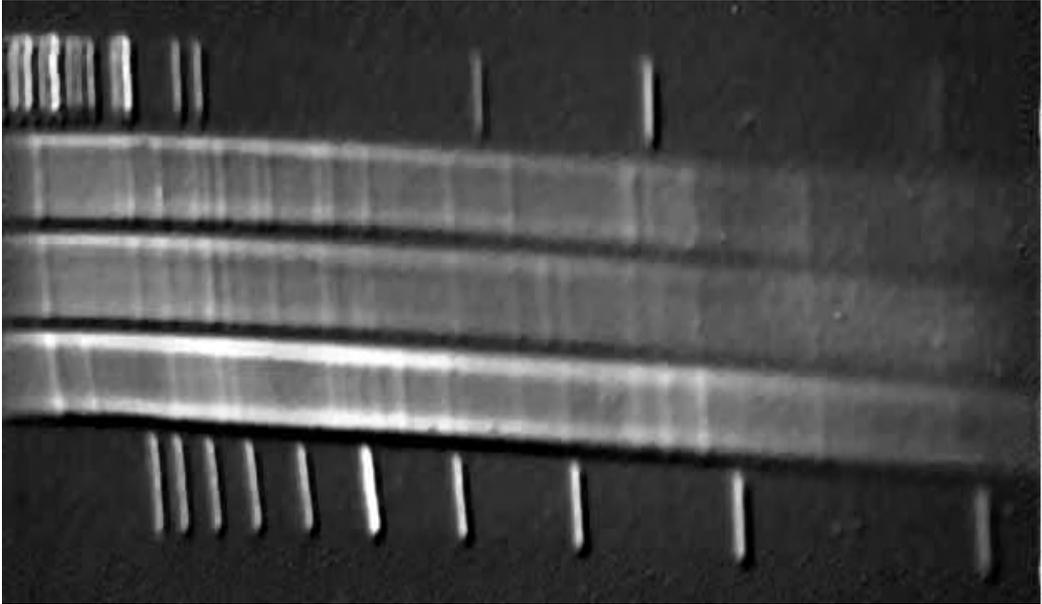


Abb. 15: Herpesvirus-DNA gespalten mit BamH I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

Die Isolate der Restriktionsgruppe I, gespalten mit Hind III:

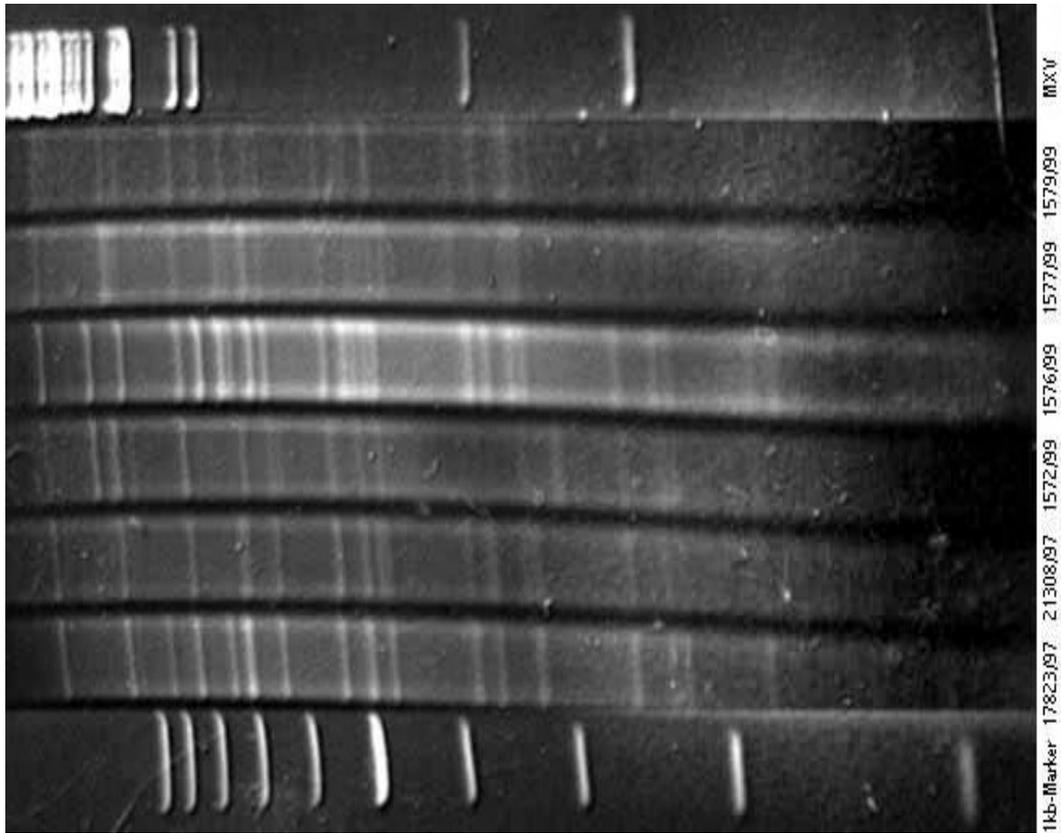


Abb. 17: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 8: DNA-Marker

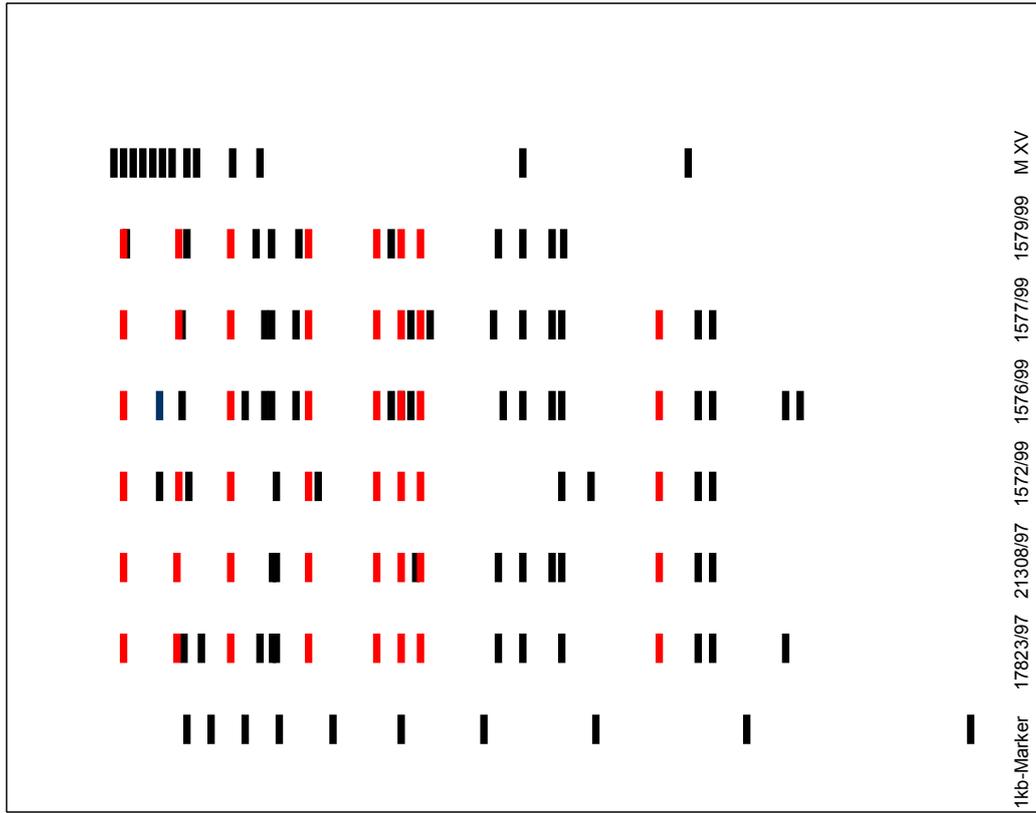


Abb. 18: Schematische Darstellung von Abb. 17

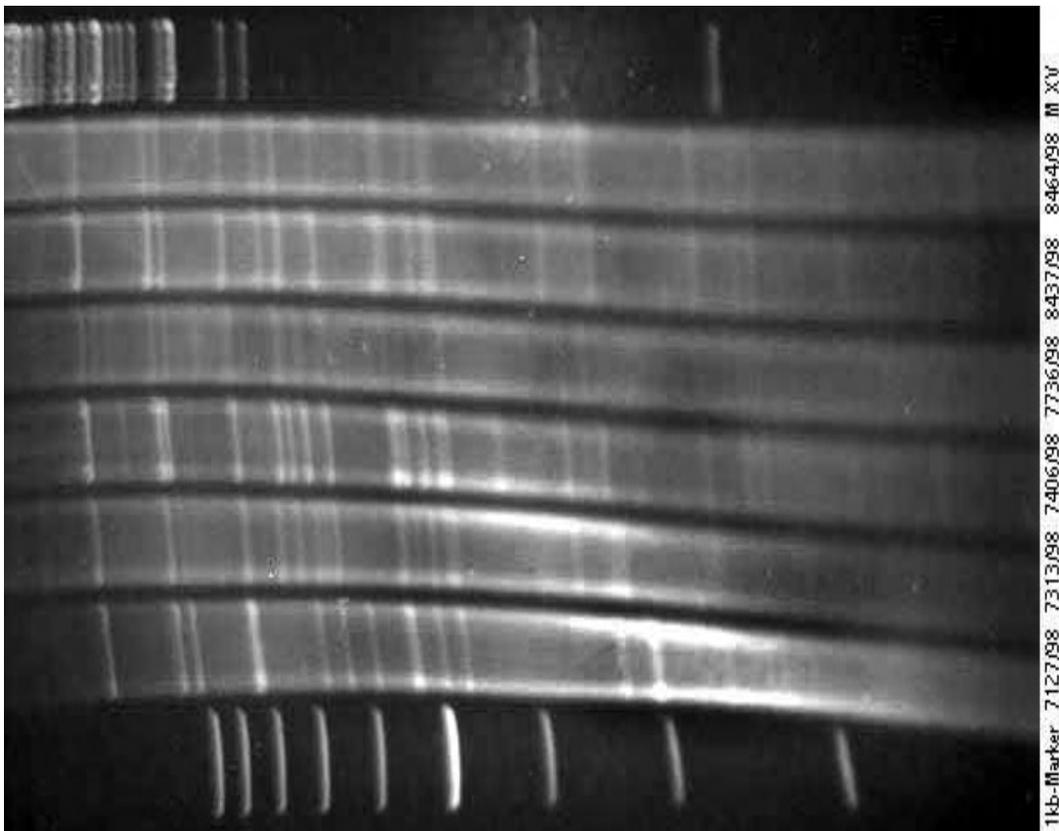


Abb. 19: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 8: DNA-Marker

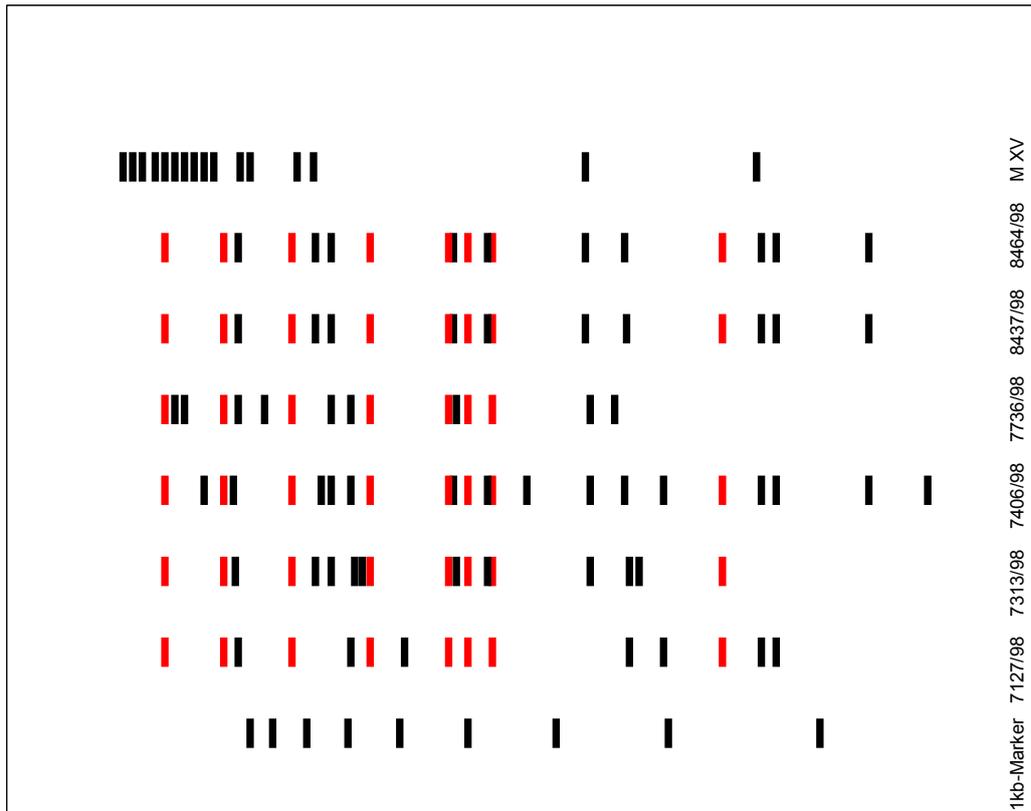


Abb. 20: Schematische Darstellung von Abb. 19

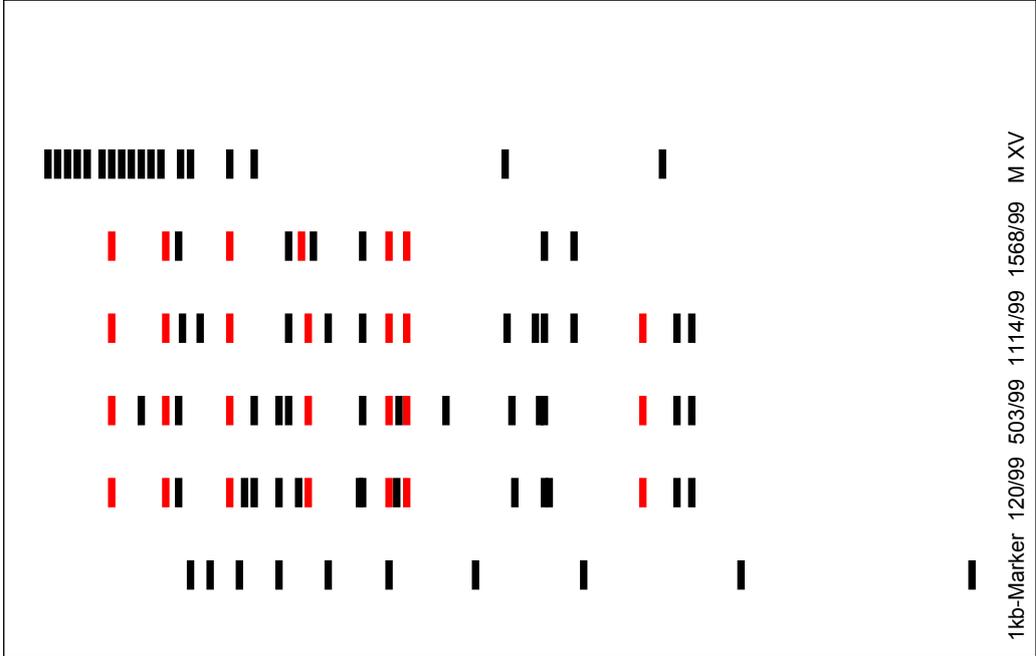


Abb. 22: Schematische Darstellung von Abb. 21

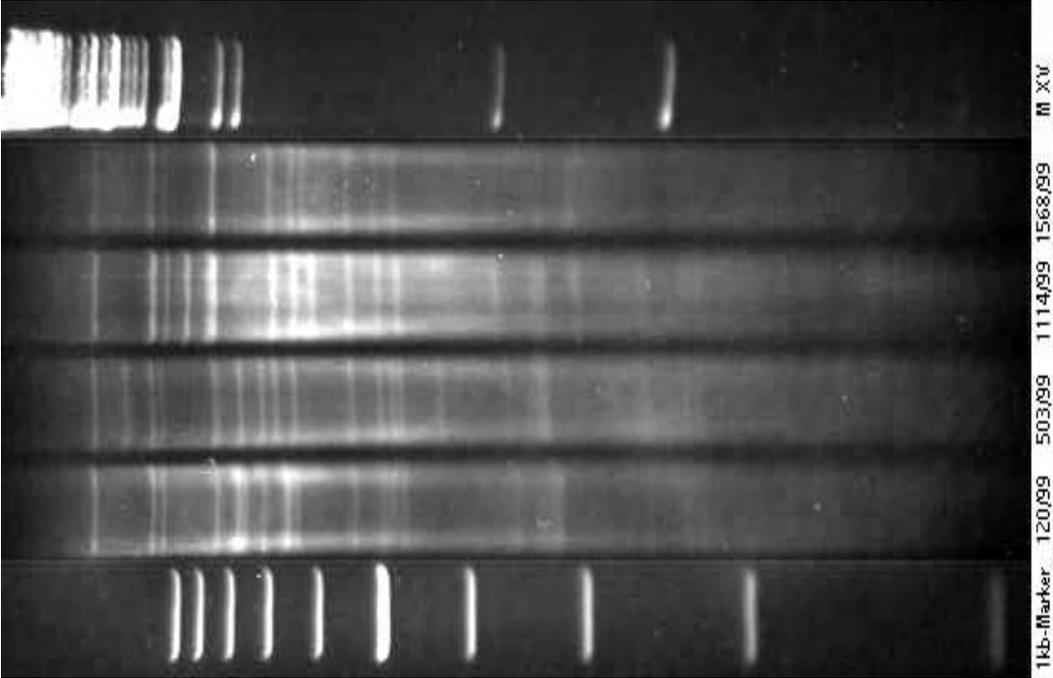


Abb. 21: Herpesvirus-DNA, gespalten von Hind III, Spur 1 und 6: DNA-Marker

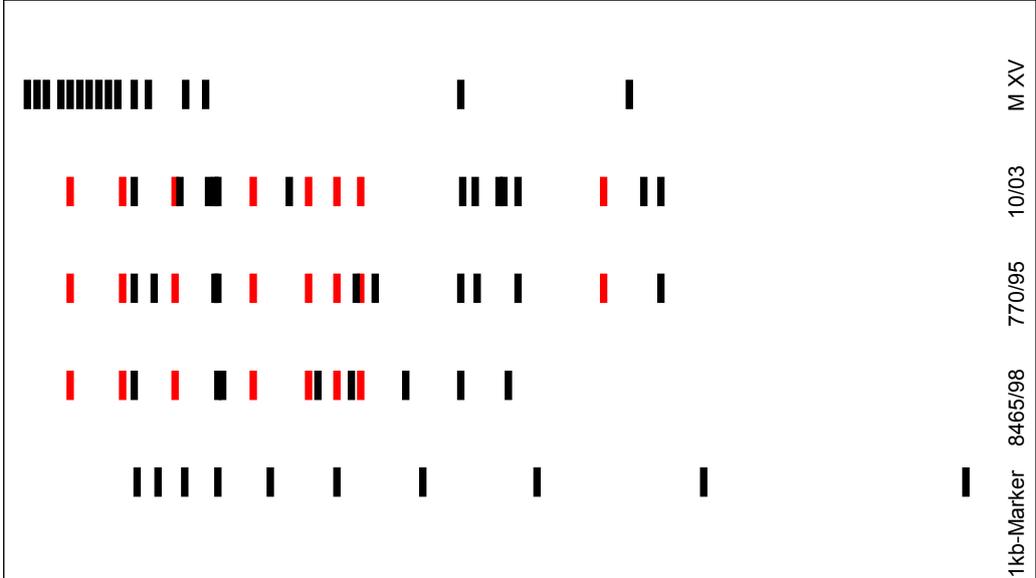


Abb. 24: Schematische Darstellung von Abb. 23

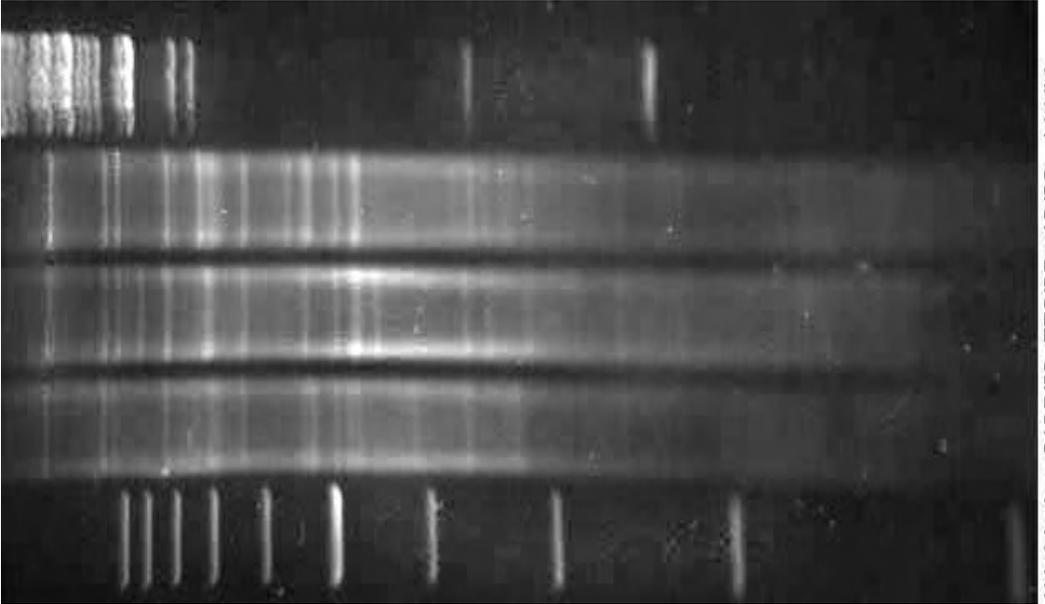


Abb. 23: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 5: DNA-Marker

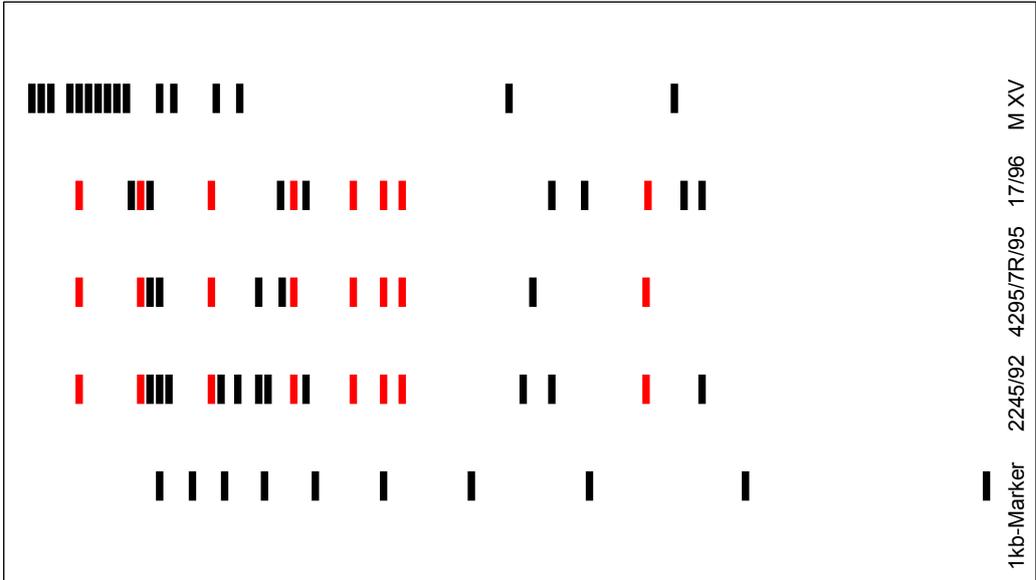


Abb. 26: Schematische Darstellung von Abb. 25

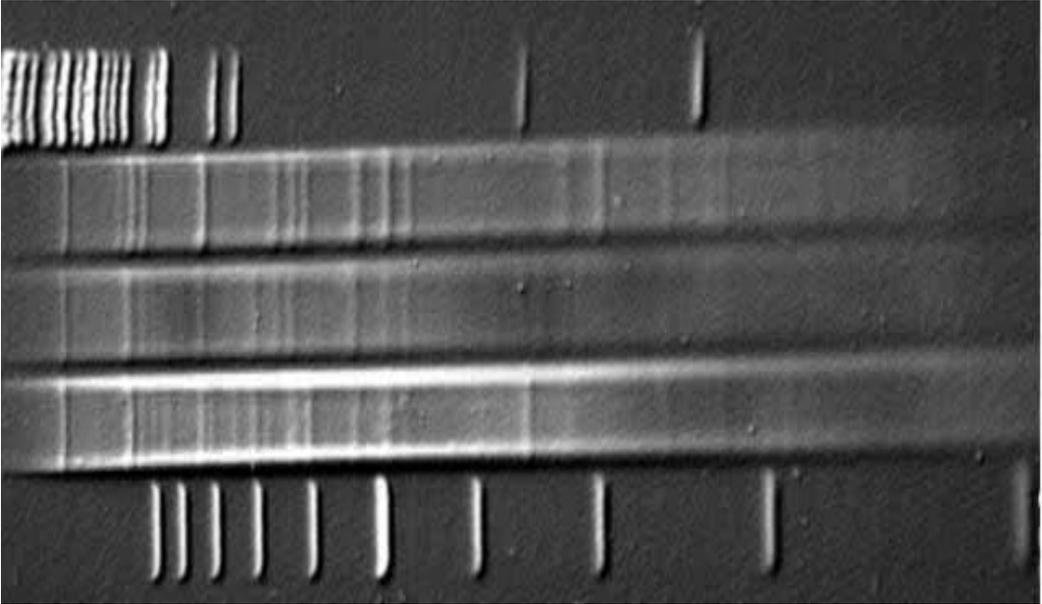


Abb. 25: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 5: DNA-Marker

Die Isolate der Restriktionsgruppe I, gespalten mit Sal I:

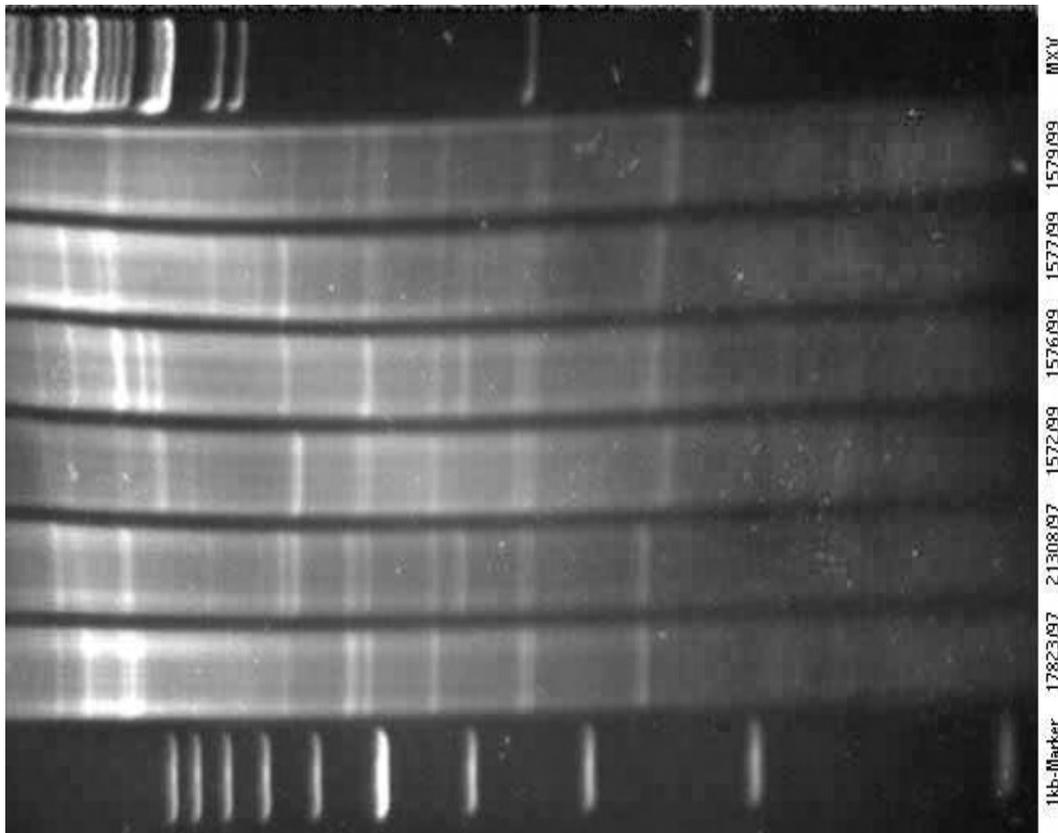


Abb. 27: Herpesvirus-DNA, gespalten von Sal I, Spur 1 und 8: DNA-Marker

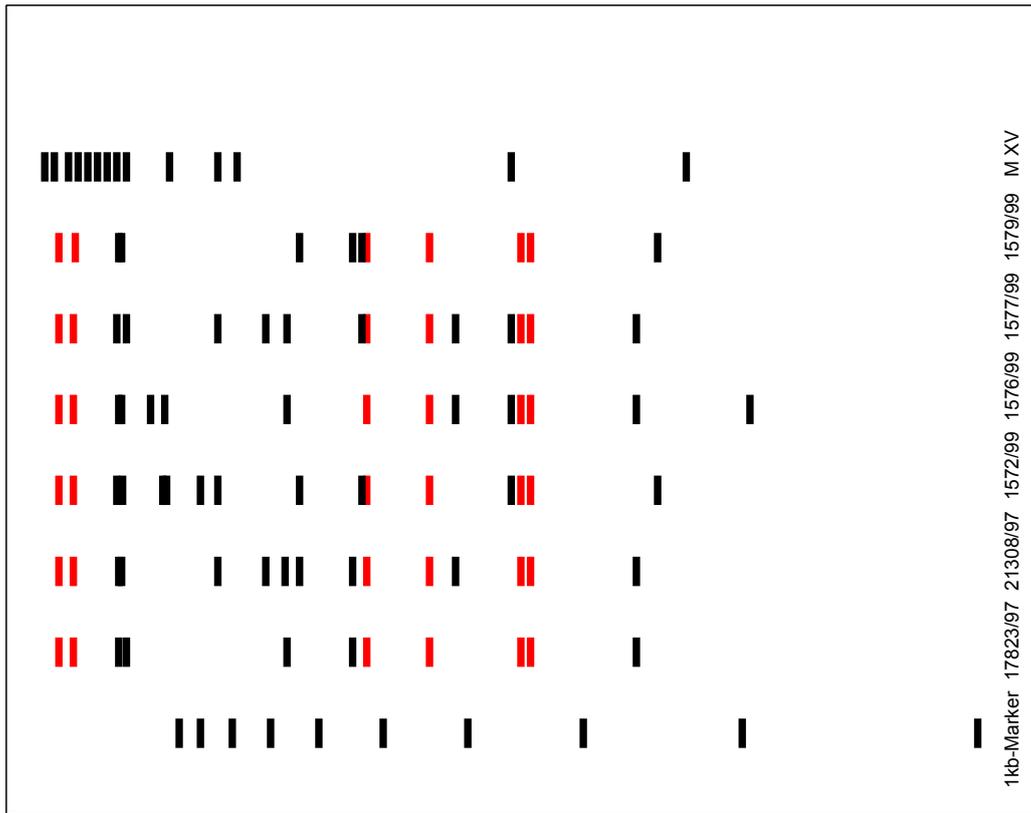


Abb. 28: Schematische Darstellung von Abb. 27

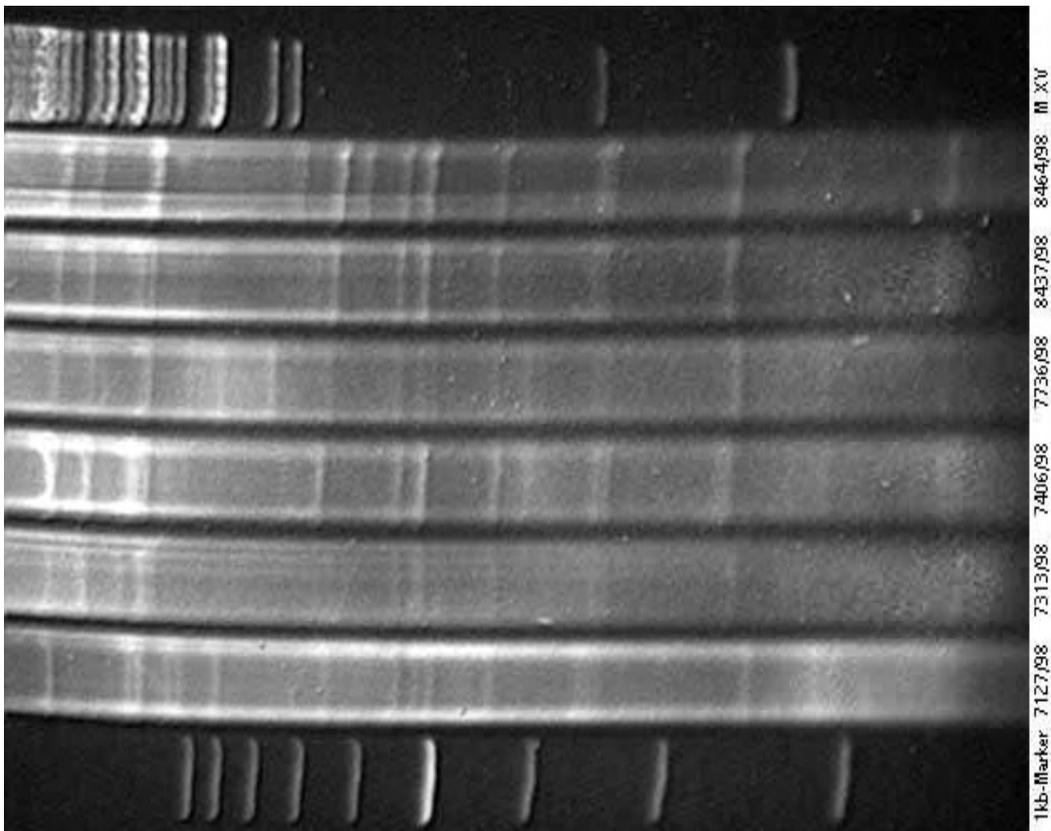


Abb. 29: Herpesvirus-DNA, gespalten von Sal I, Spur 1 und 8: DNA-Marker

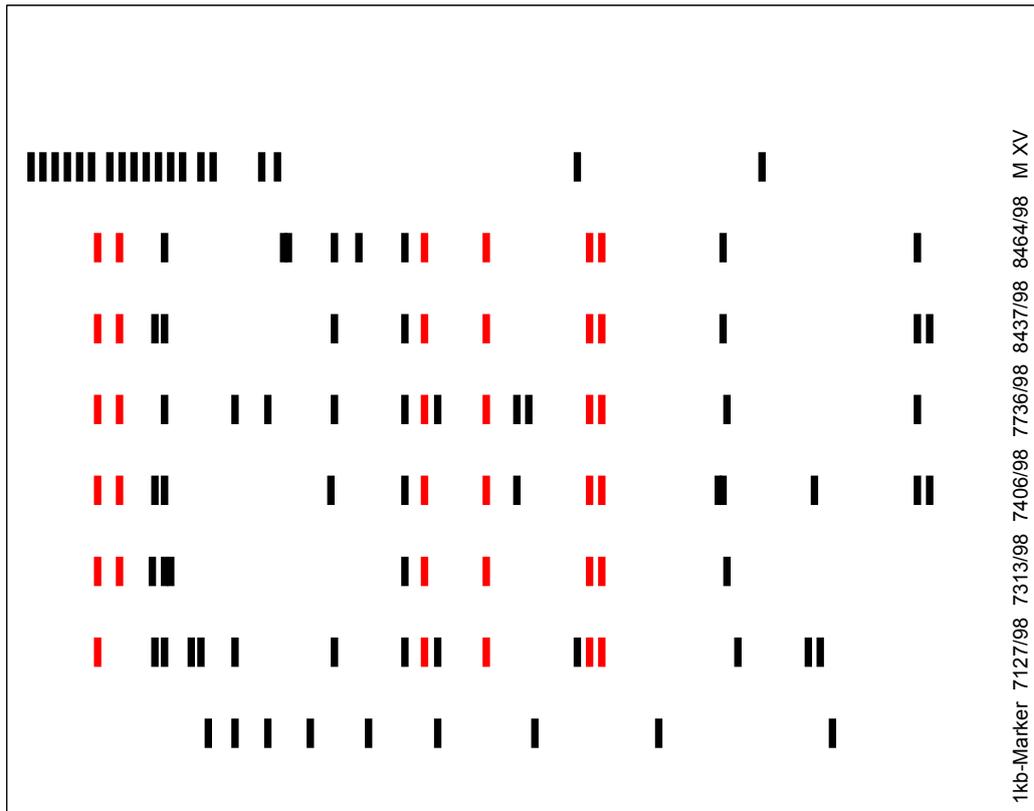


Abb. 30: Schematische Darstellung von Abb. 29

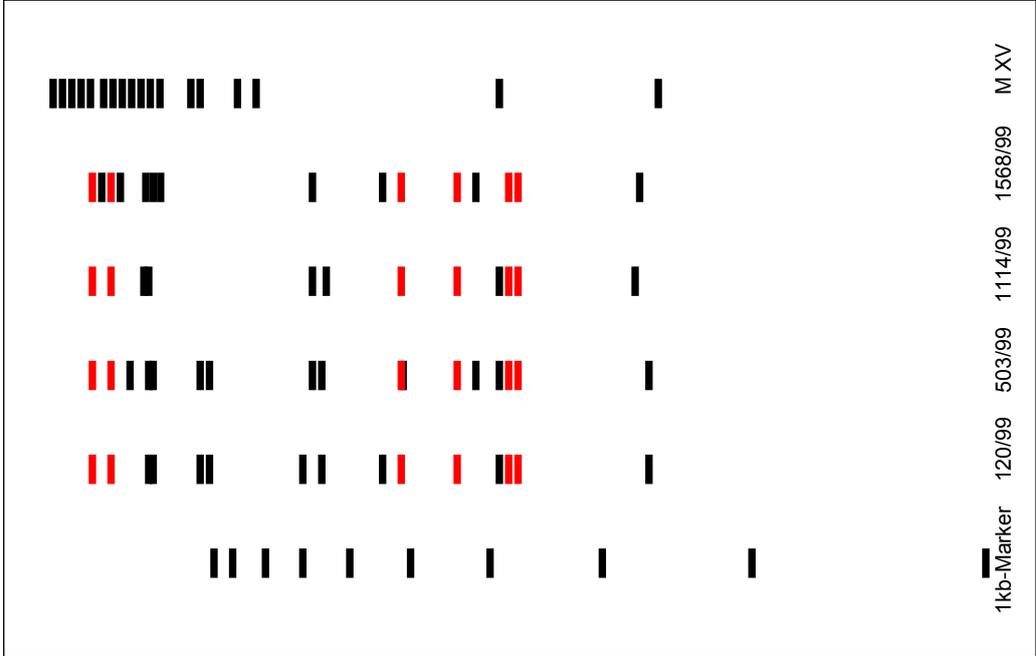


Abb. 32: Schematische Darstellung von Abb. 31

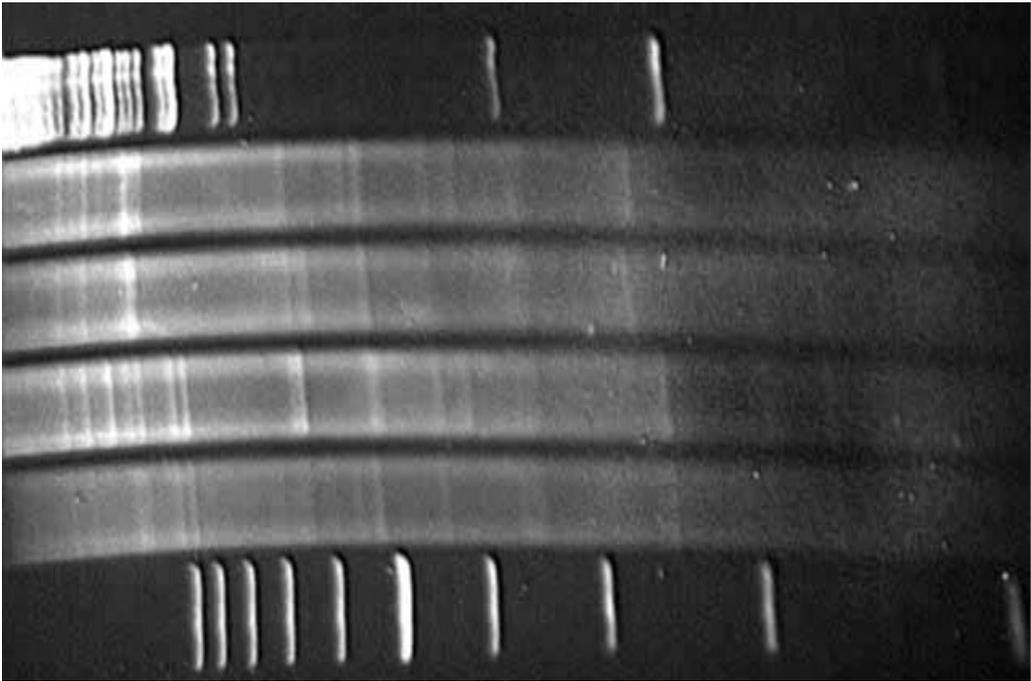


Abb. 31: Herpesvirus-DNA, gespalten von Sal I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

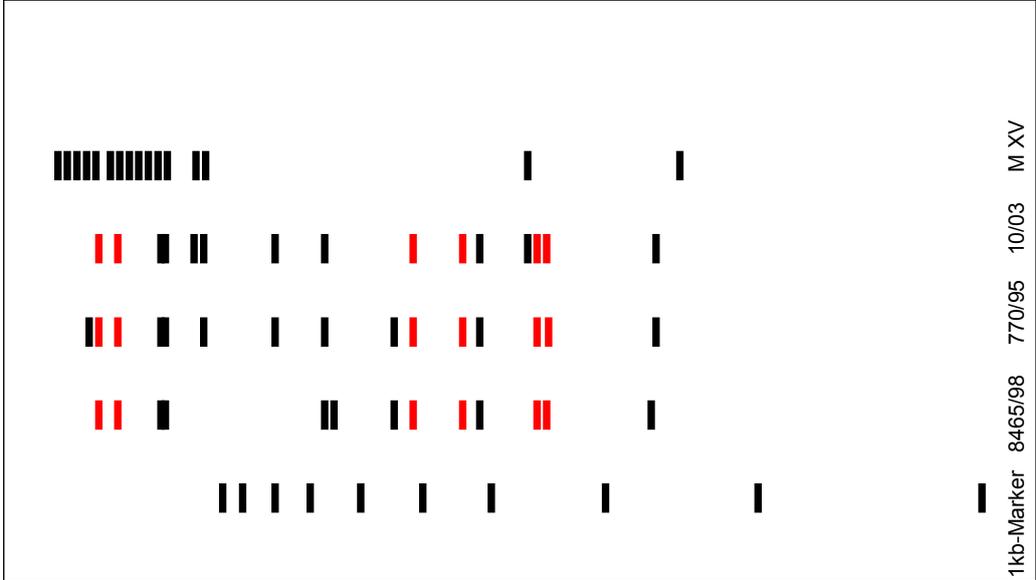


Abb. 34: Schematische Darstellung von Abb. 33

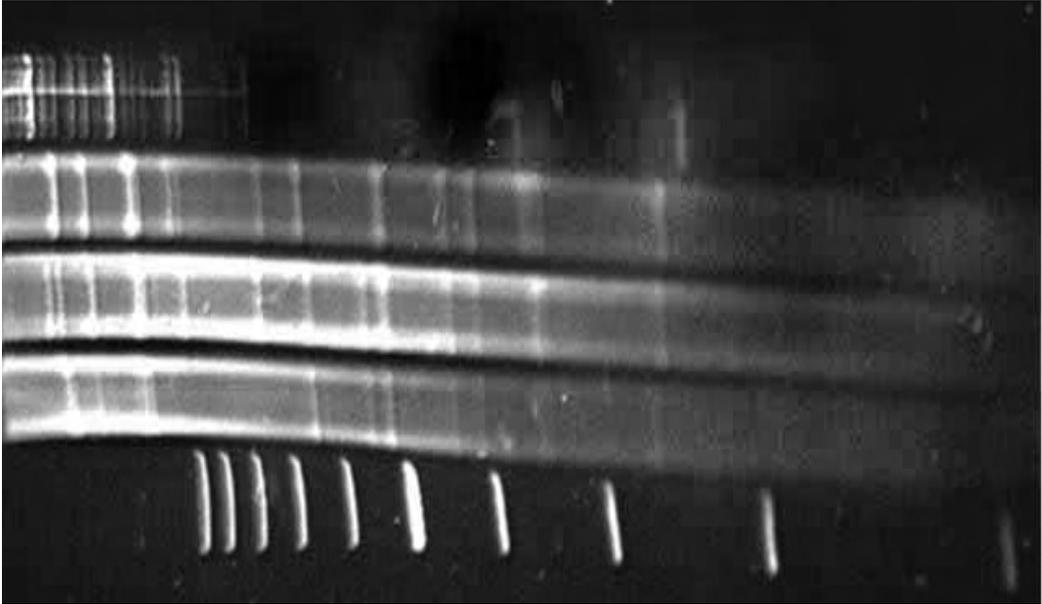


Abb. 33: Herpesvirus-DNA, gespalten von Sal I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

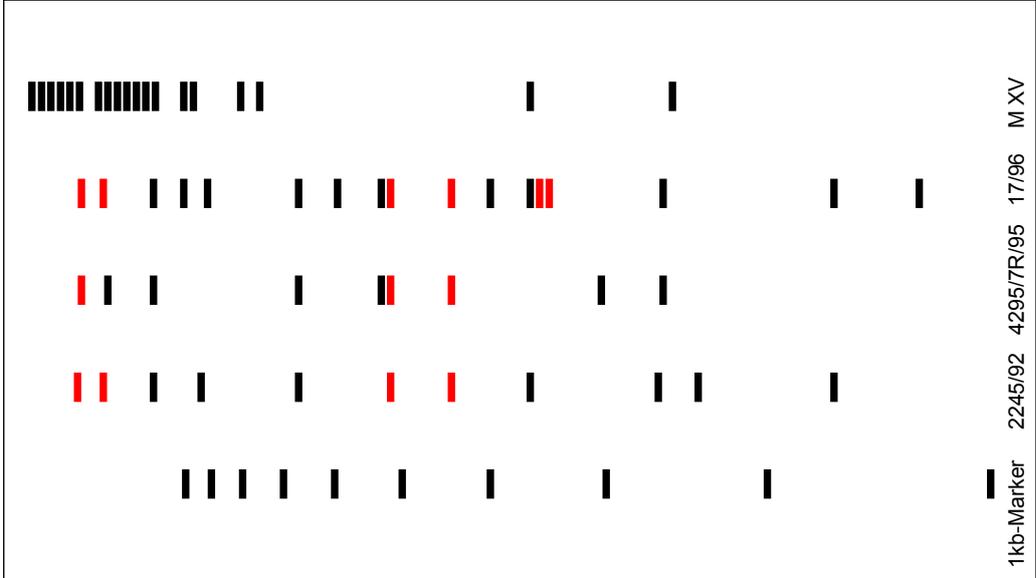


Abb. 36: Schematische Darstellung von Abb. 35

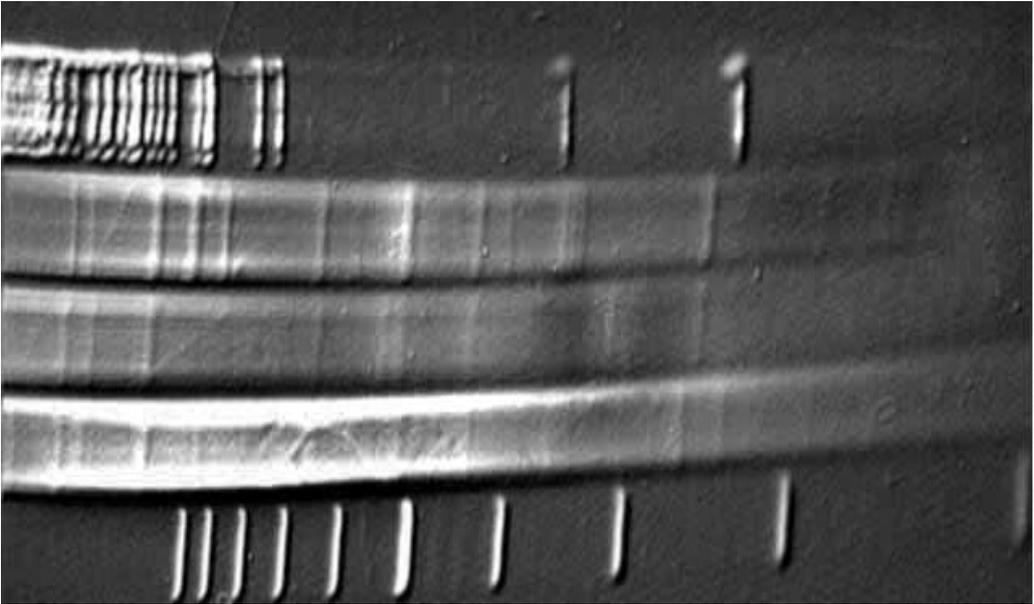


Abb. 35: Herpesvirus-DNA, gespalten von Sal I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

Die Isolate der Restriktionsgruppe II, gespalten mit BamH I:

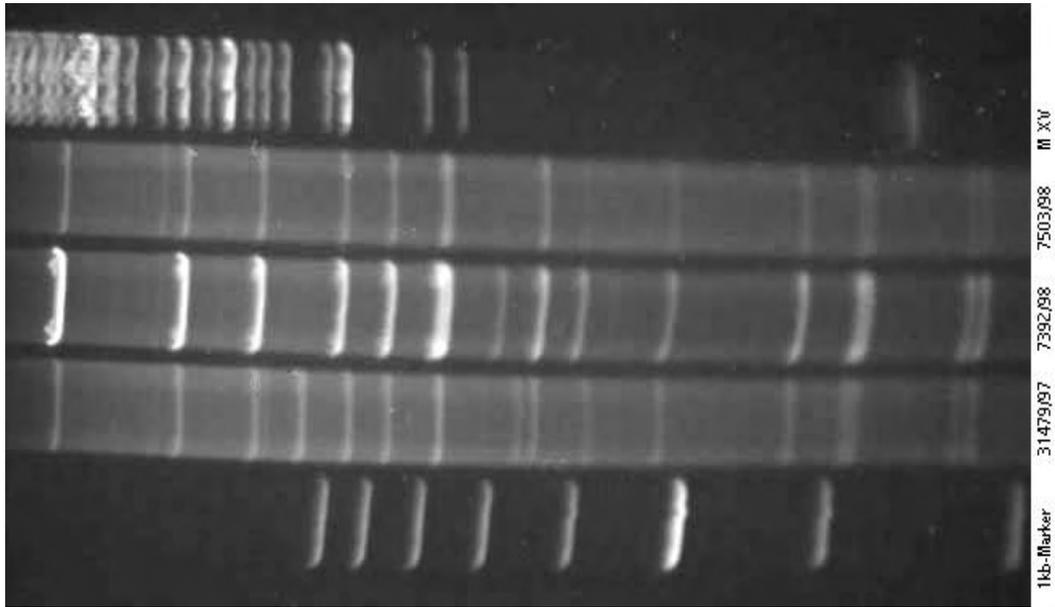


Abb. 37: Herpesvirus-DNA, gespalten von BamH I Spur 1 und 5: DNA-Marker

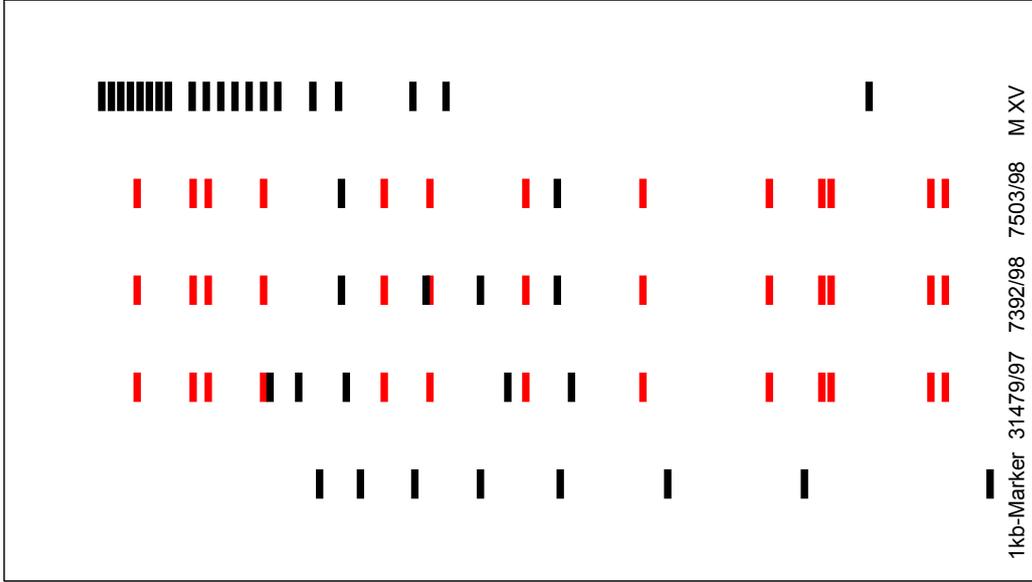


Abb. 38: Schematische Darstellung von Abb. 37

Die Isolate der Restriktionsgruppe II, gespalten mit Hind III:

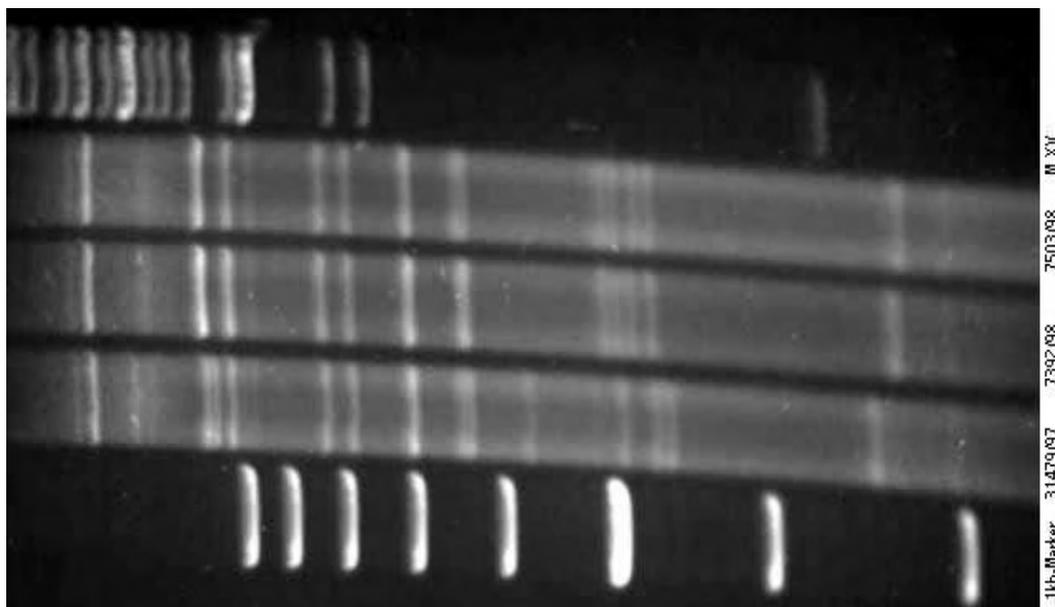


Abb. 39: Herpesvirus-DNA, gespalten von Hind III, Spur 1 und 5: DNA-Marker

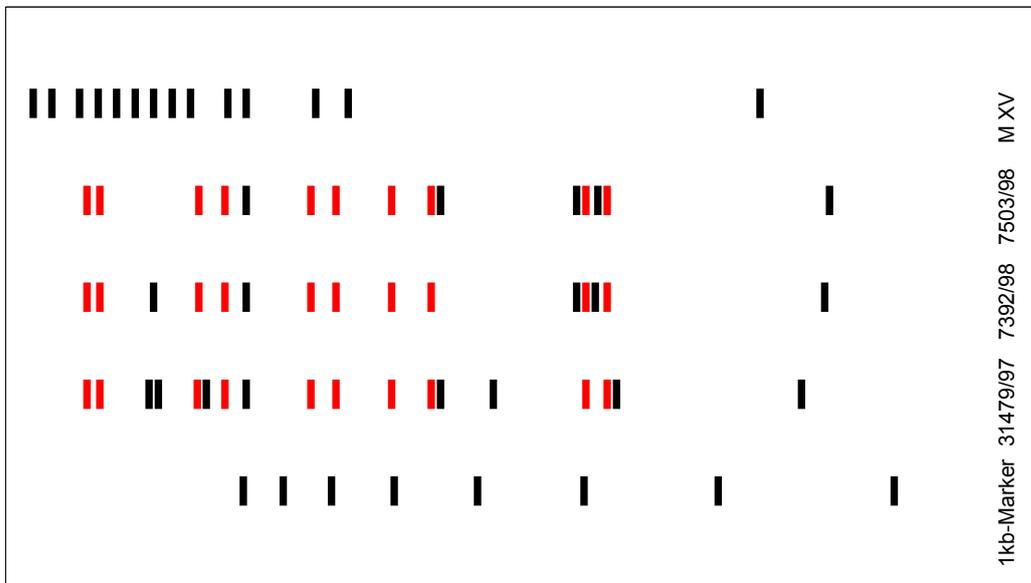
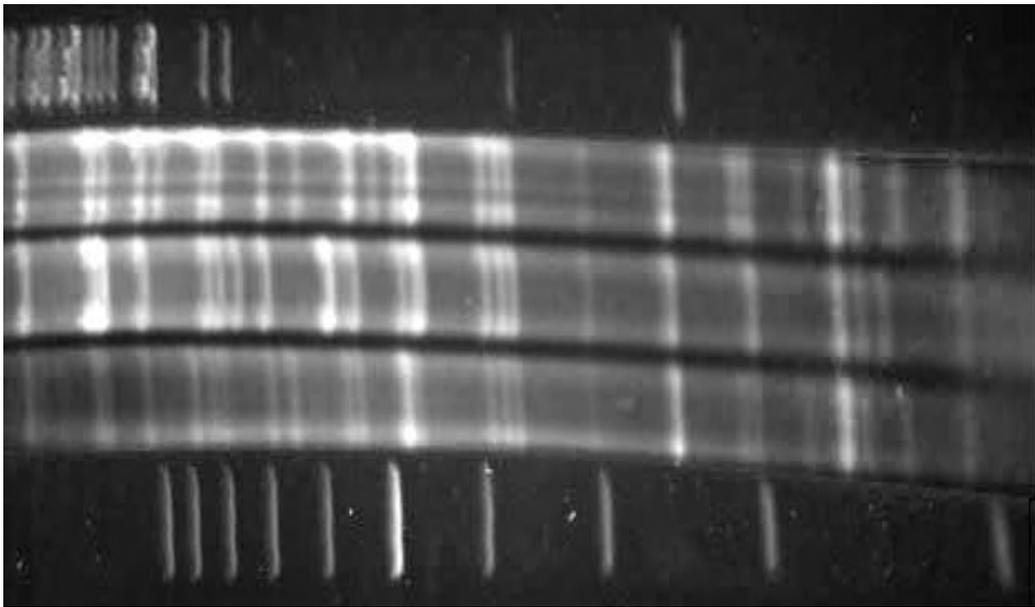


Abb. 40: Schematische Darstellung von Abb. 39

Die Isolate der Restriktionsgruppe III, gespalten mit BamH I:



1kb-Marker B02 1432/94 1261/02 M XV

Abb. 43: Herpesvirus-DNA, gespalten von BamH I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

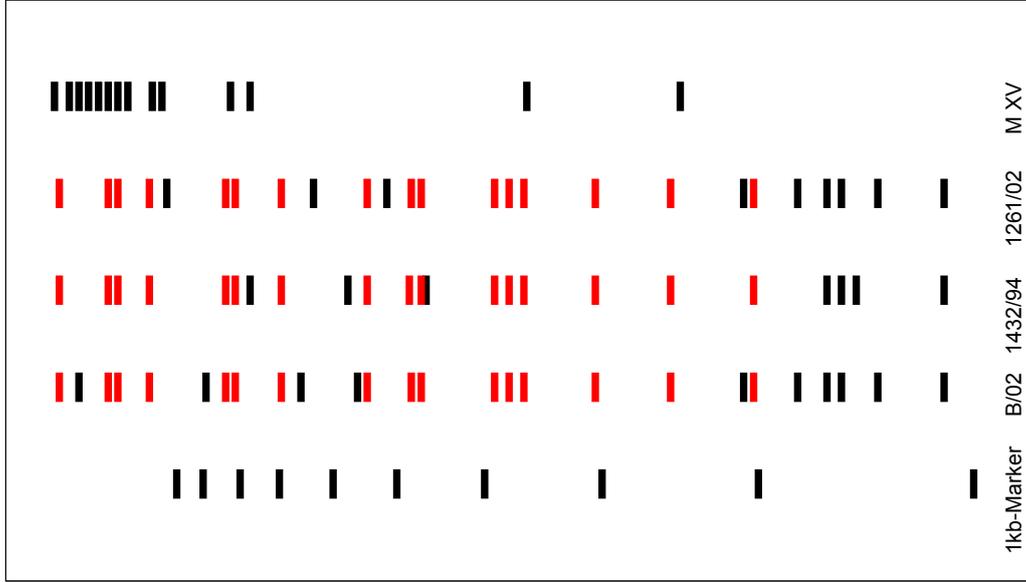


Abb. 44: Schematische Darstellung von Abb. 43

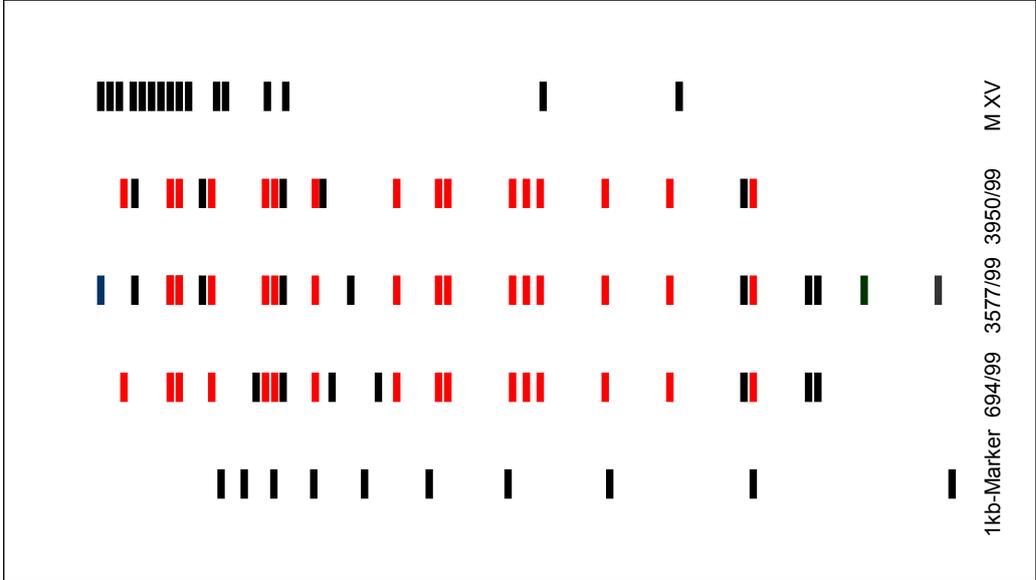
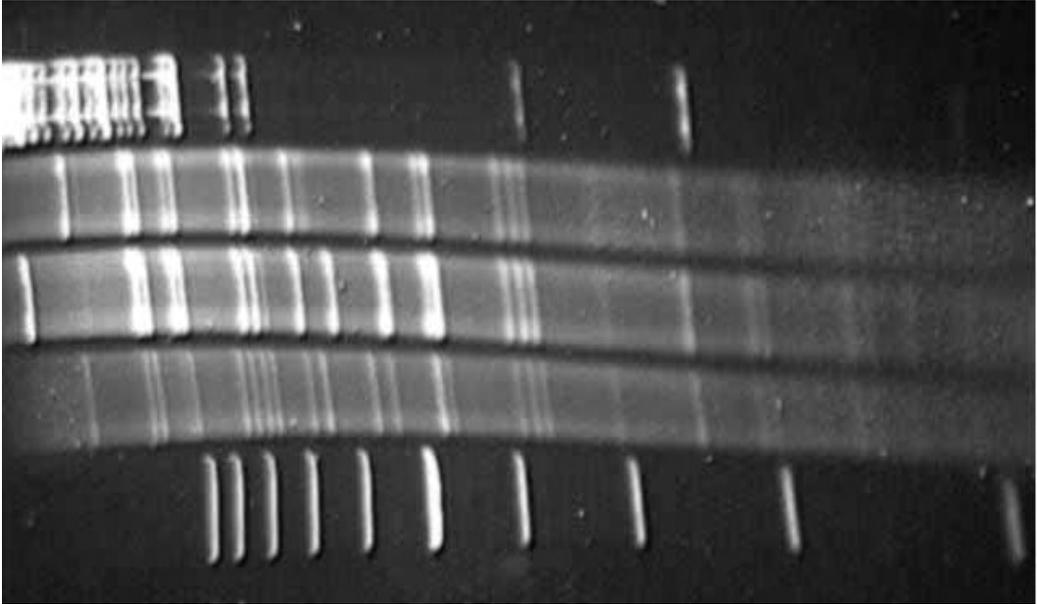


Abb. 46: Schematische Darstellung von Abb. 45



1kb-Marker 694/99 3577/99 3950/99 M XV

Abb. 45: Herpesvirus-DNA, gespalten mit BamH I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

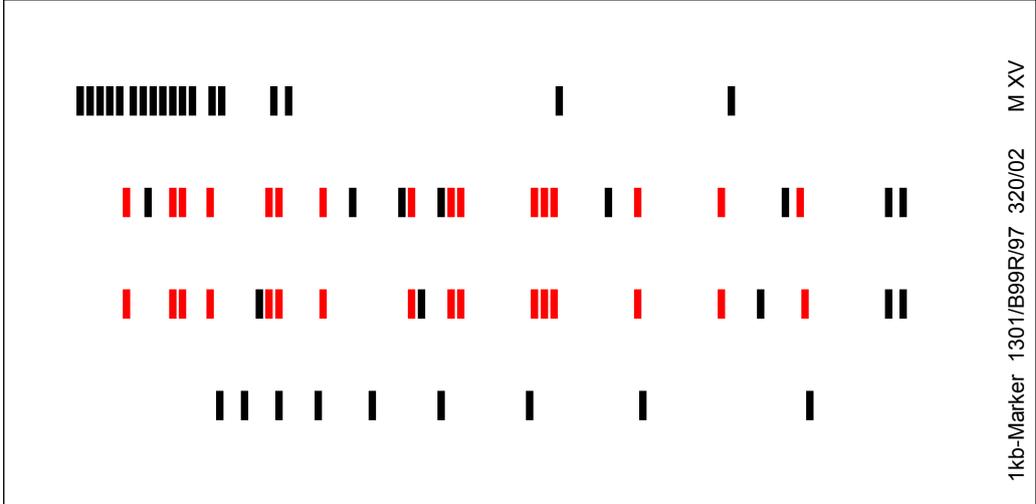


Abb. 48: Schematische Darstellung von Abb. 47

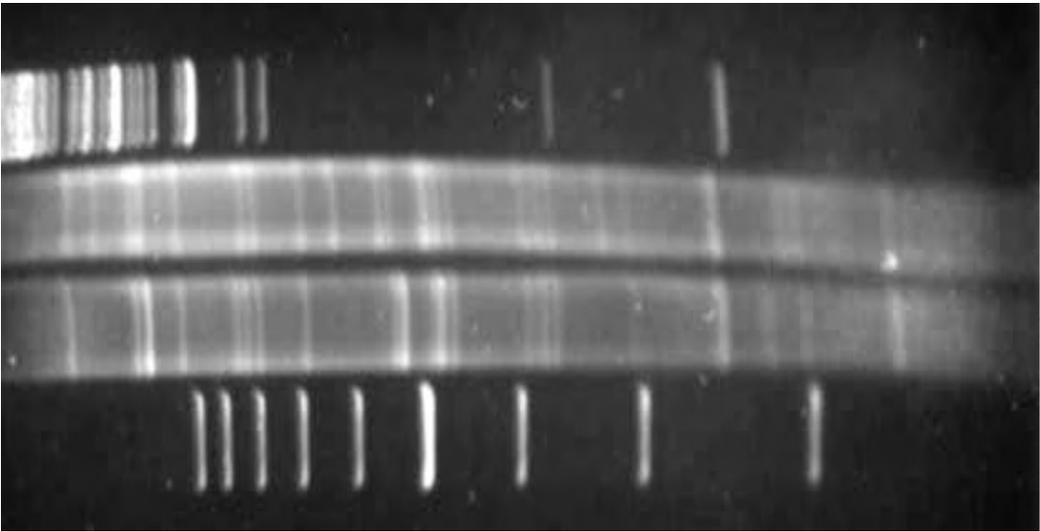


Abb. 47: Herpesvirus-DNA, gespalten mit BamH I, Spur 1 und 4: DNA-Marker

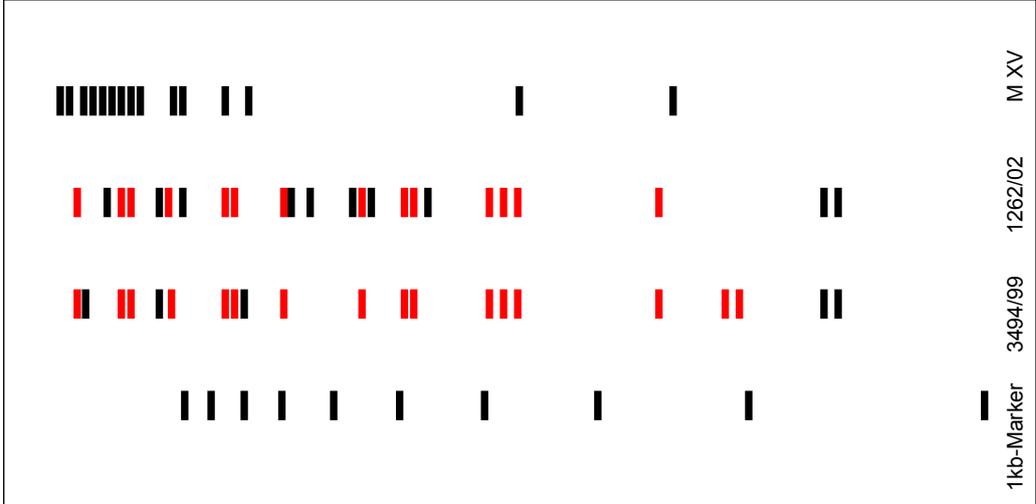


Abb. 50: Schematische Darstellung von Abb. 49

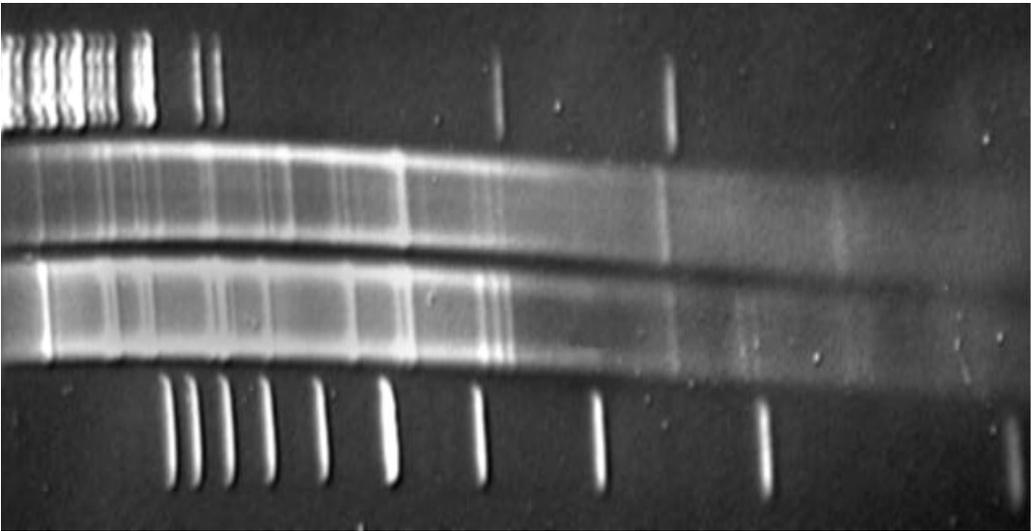
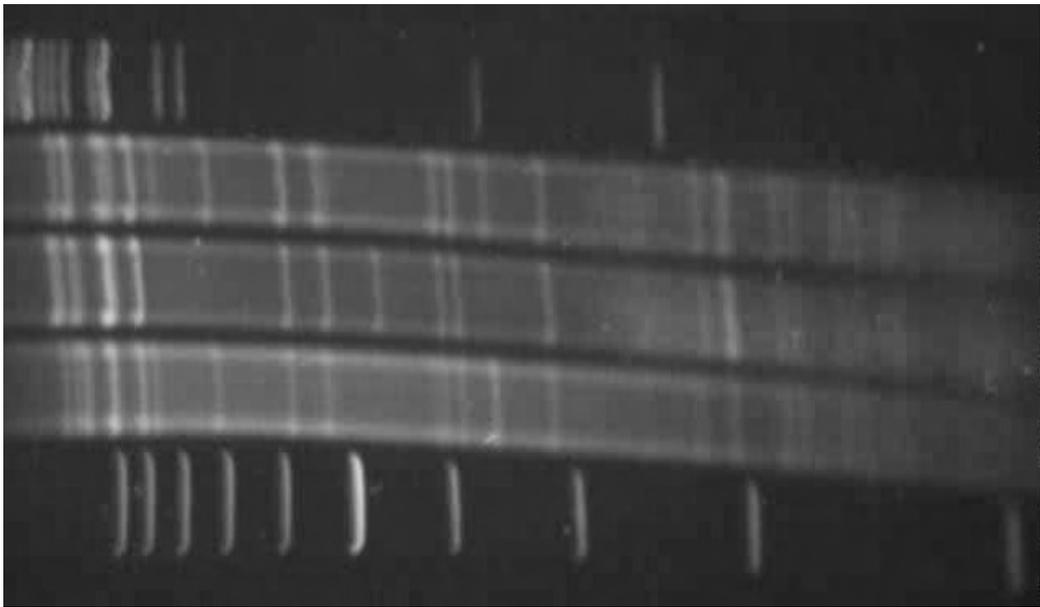


Abb. 49: Herpesvirus-DNA, gespalten mit BamH I, Spur 1 und 4: DNA-Marker

Die Isolate der Restriktionsgruppe III, gespalten mit Hind III:



1kb-Marker B/02 1432/94 1261/02 M XV

Abb. 51: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 5: DNA-Marker

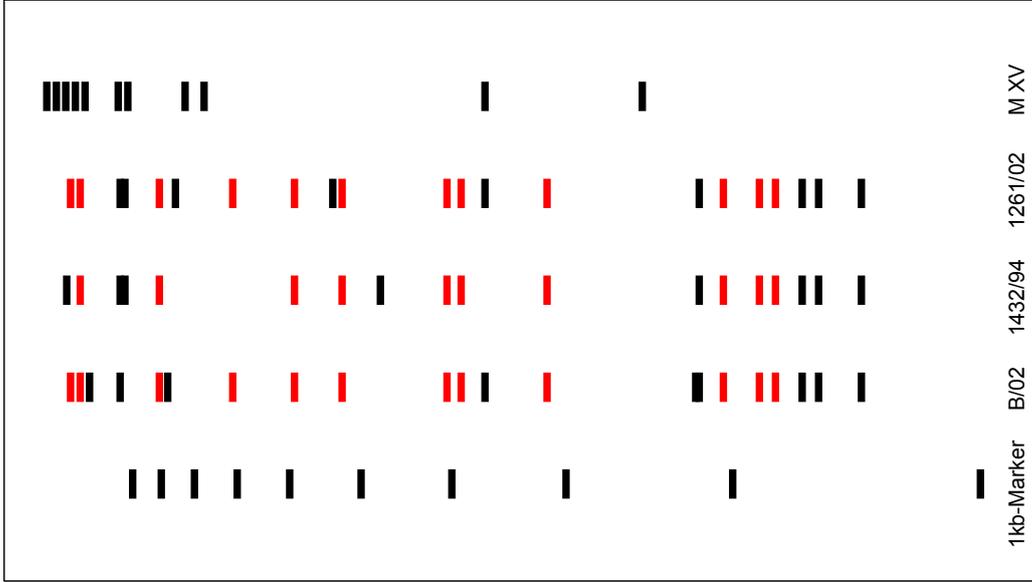


Abb. 52: Schematische Darstellung von Abb. 51

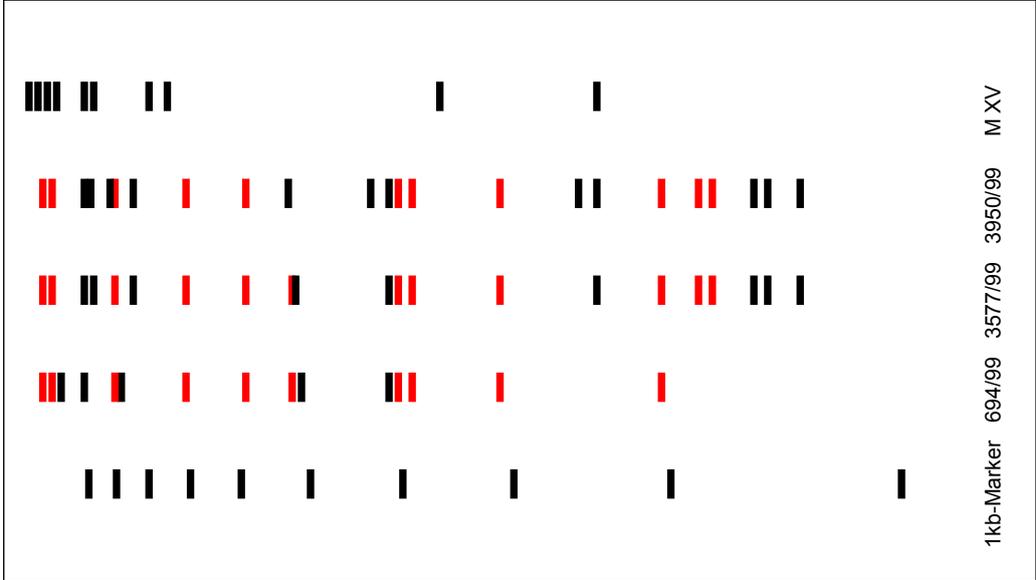


Abb. 54: Schematische Darstellung von Abb. 53

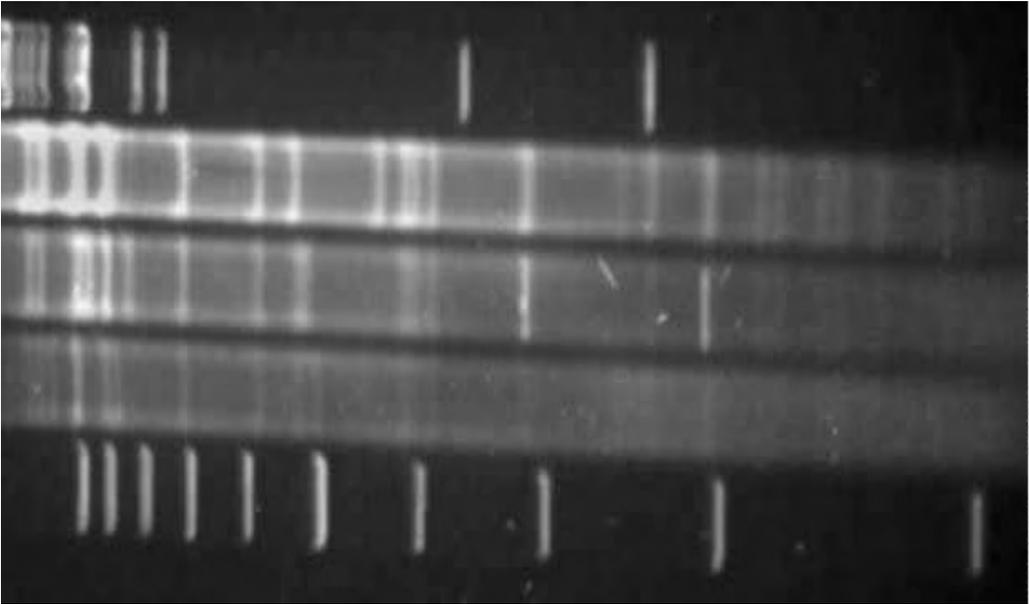


Abb. 53: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 5: DNA-Marker

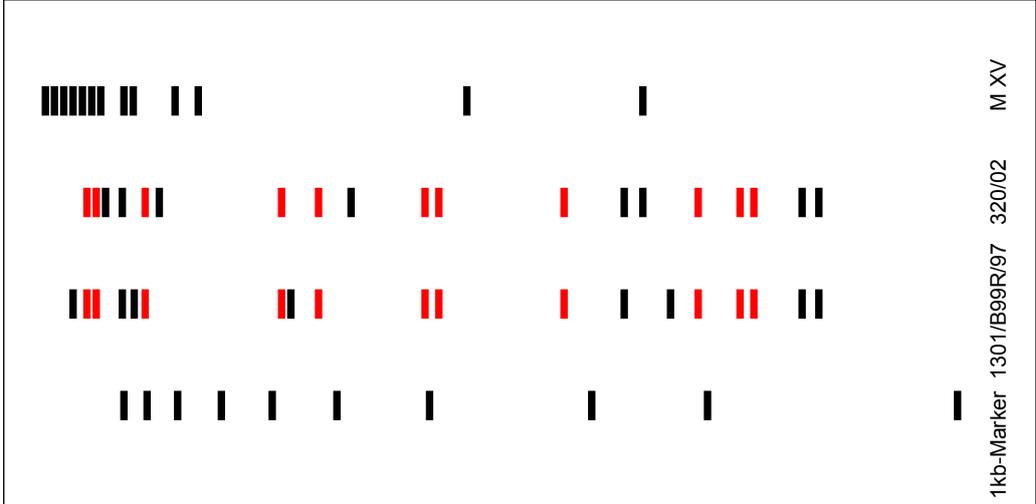


Abb. 56: Schematische Darstellung von Abb. 55

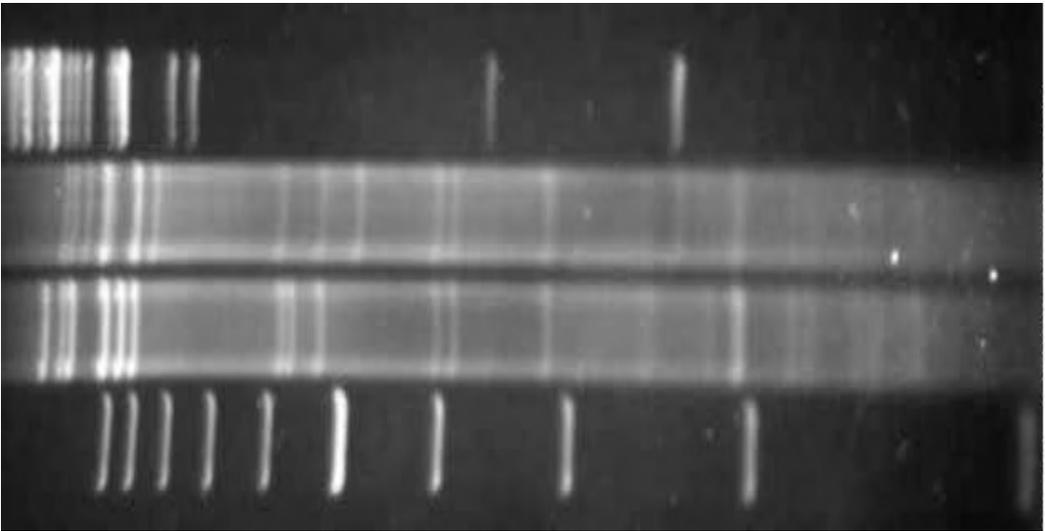


Abb. 55: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 4: DNA-Marker

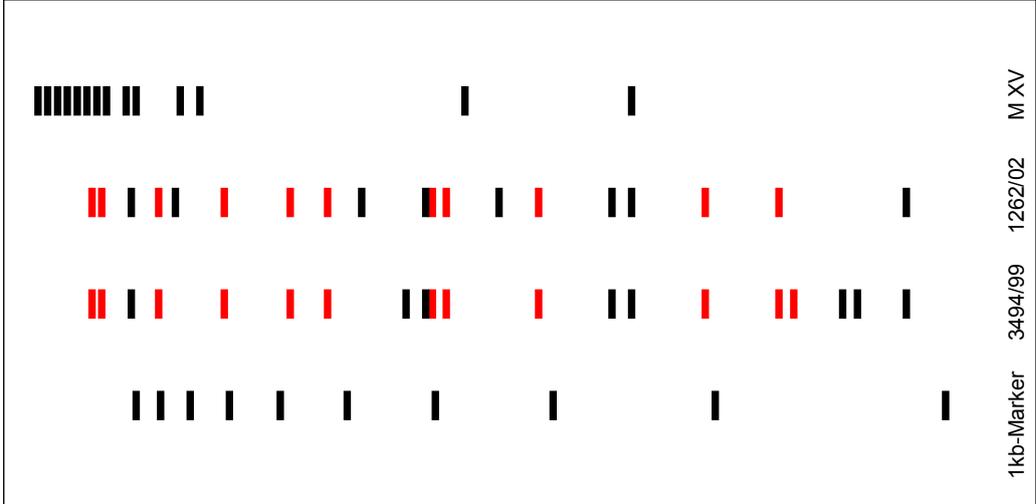


Abb. 58: Schematische Darstellung von Abb. 57

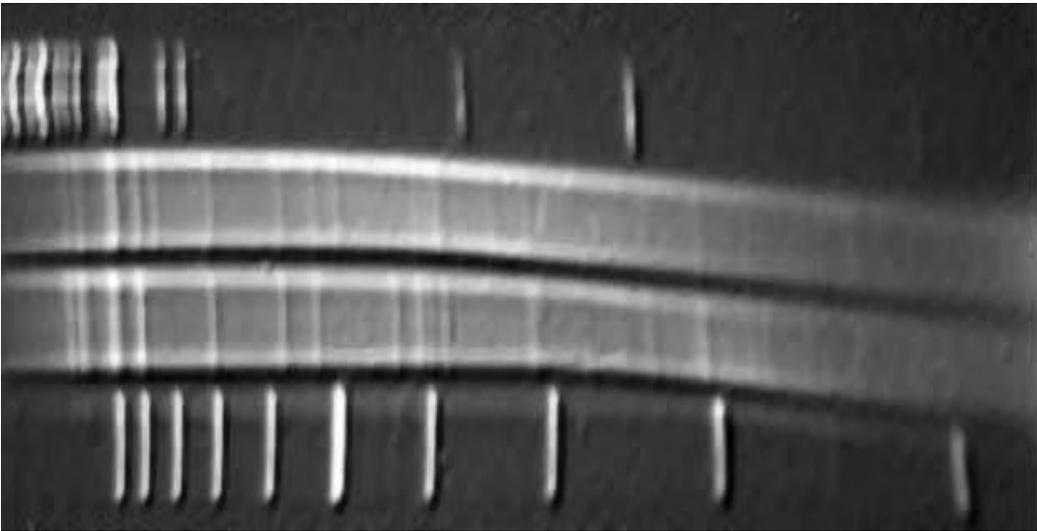
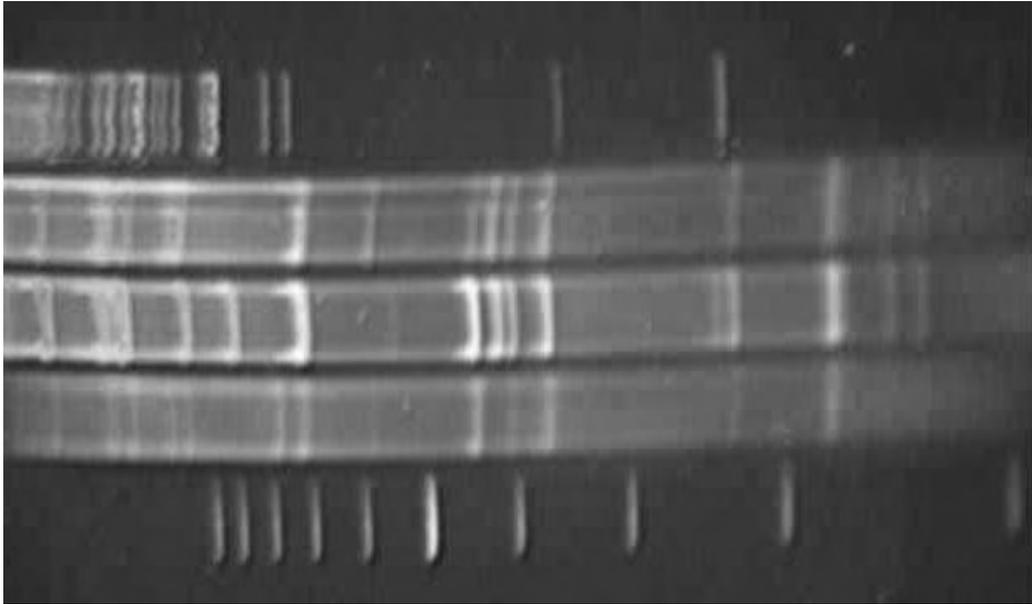


Abb. 57: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Hind III, Spur 1 und 4: DNA-Marker

Die Isolate der Restriktionsgruppe III gespalten mit Sal I:



1 kb-Marker B/02 1432/94 1261/02 M XV

Abb. 59: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Sal I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

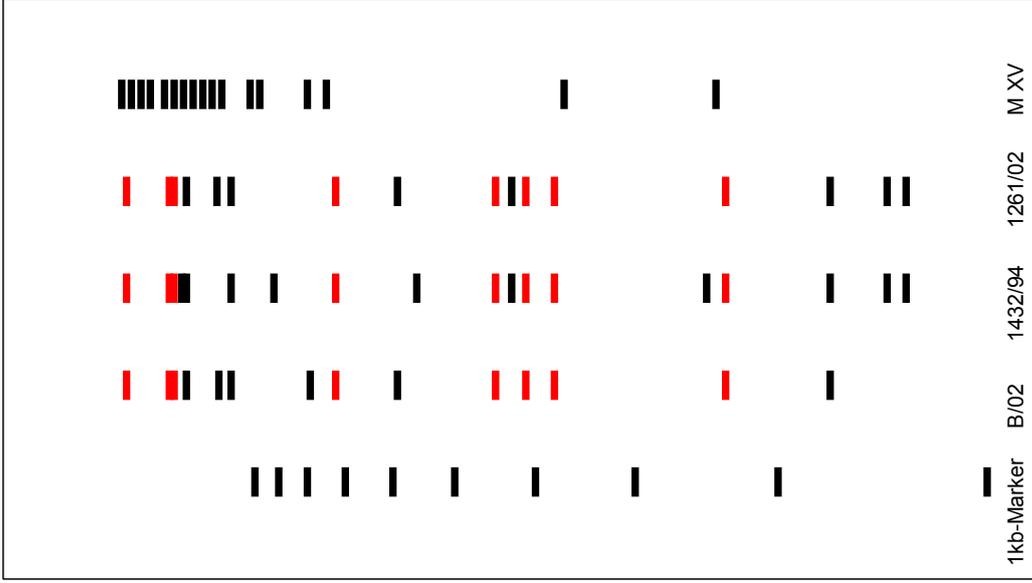


Abb. 60: Schematische Darstellung von Abb. 59

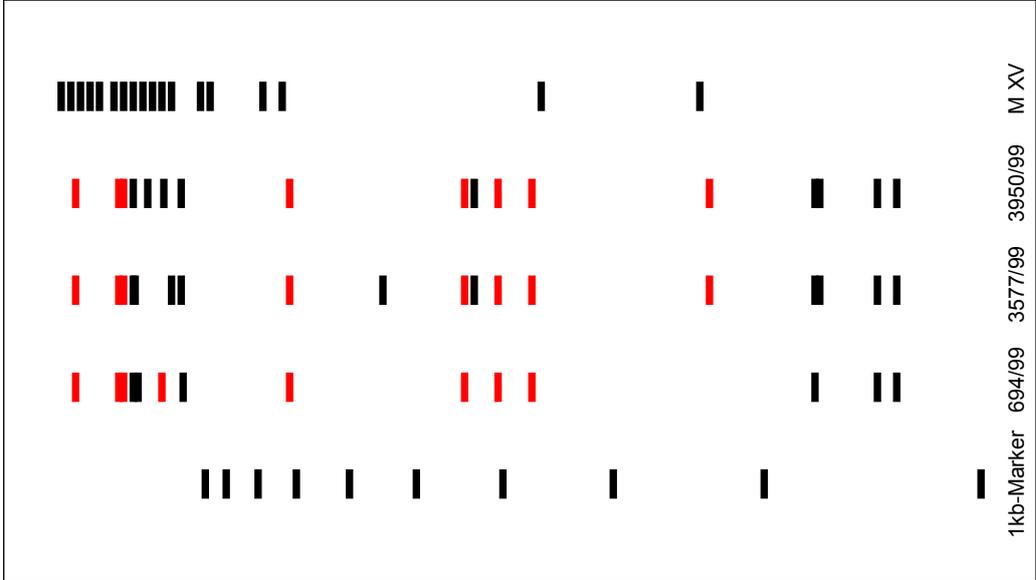


Abb. 62: Schematische Darstellung von Abb. 61

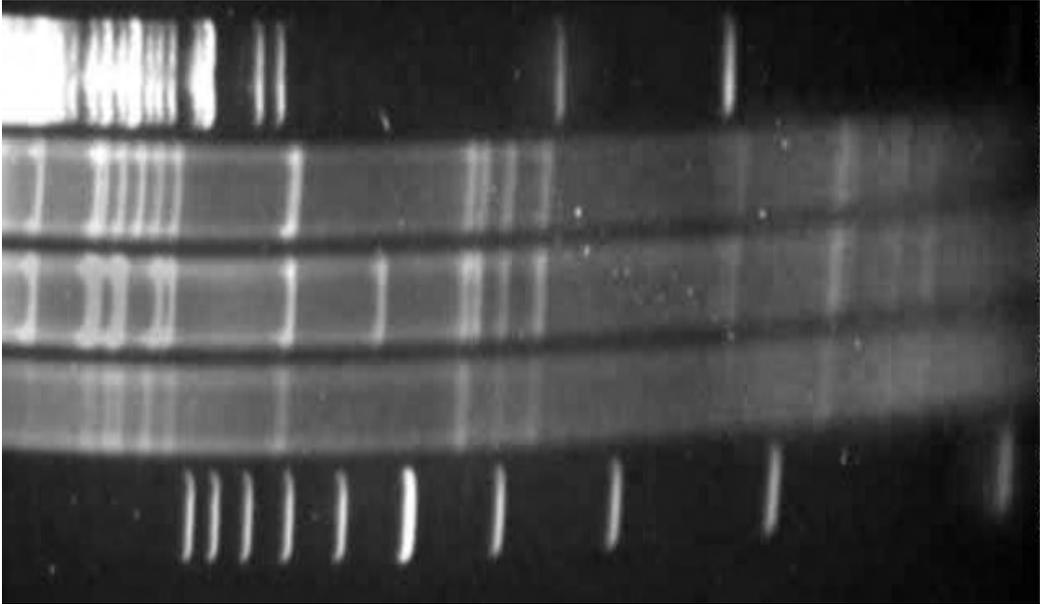


Abb. 61: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Sal I, Spur 1 und 5: DNA-Marker

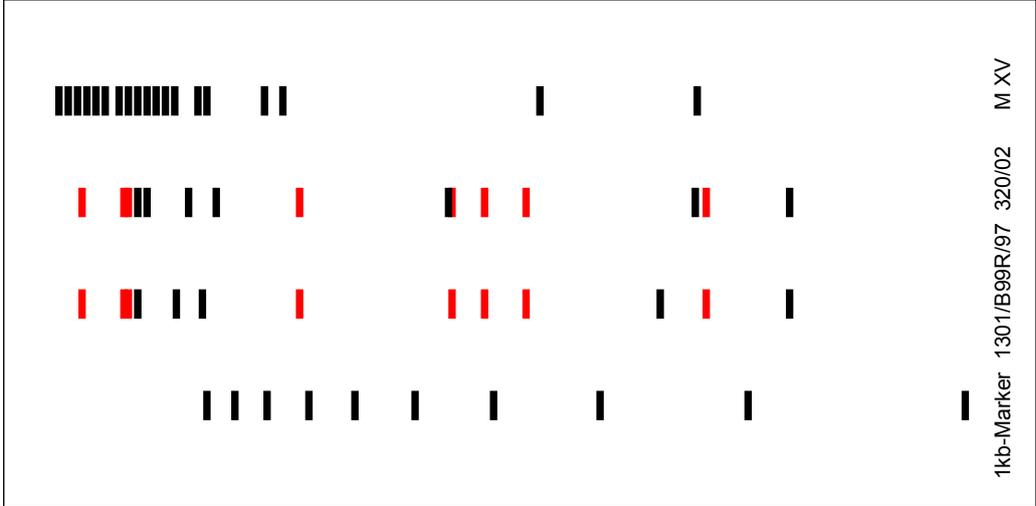


Abb. 64: Schematische Darstellung von Abb. 63

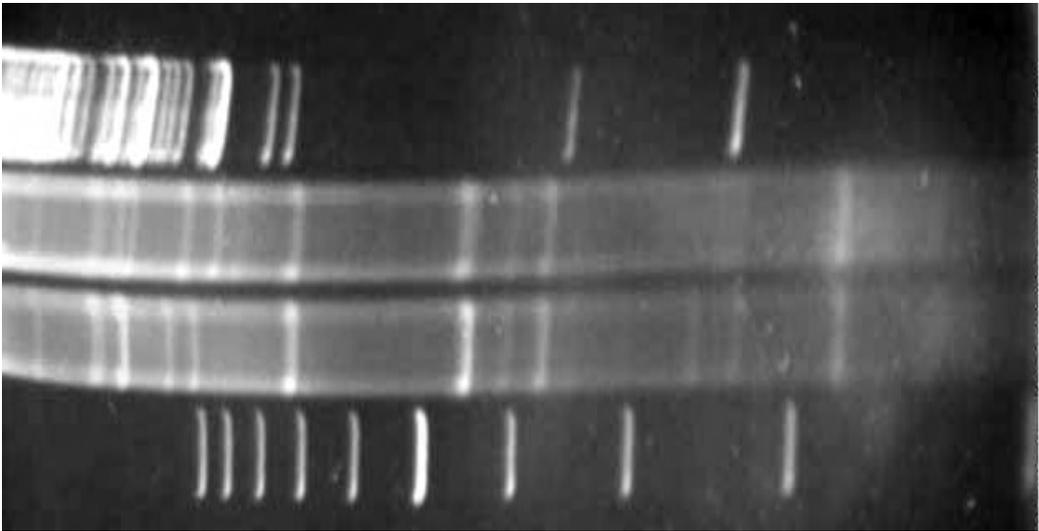


Abb. 63: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Sal I, Spur 1 und 4: DNA-Marker

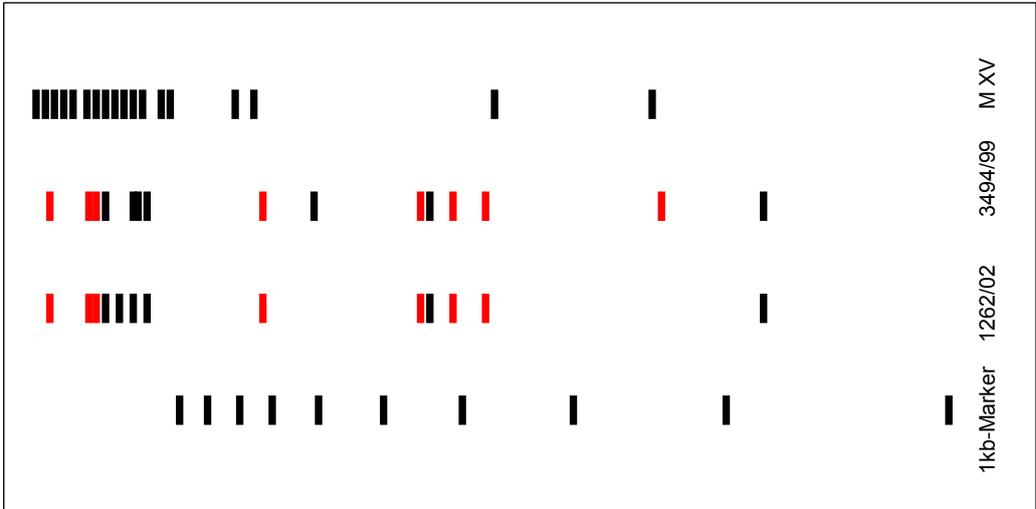


Abb. 66: Schematische Darstellung von Abb. 65

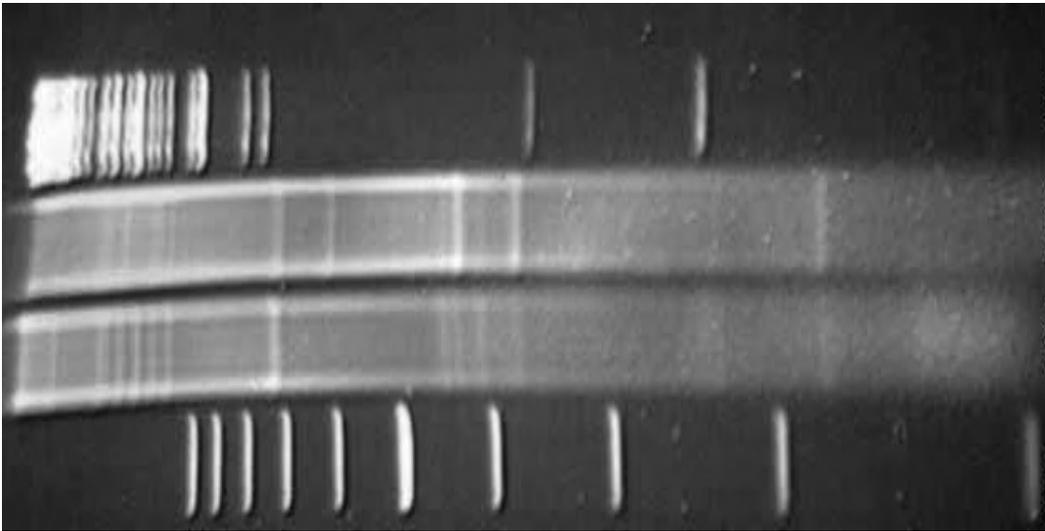


Abb. 65: Herpesvirus-DNA, gespalten mit Sal I. Spur 1 und 4: DNA-Marker

4.4 Ergebnisse der Neutralisationstests

Im Neutralisationstest wurden 49 Landschildkröten-Seren auf Antikörper gegen drei verschiedene Herpesvirus-Isolate getestet, die sich zuvor im Restriktionsendonukleasen-Muster deutlich unterschieden hatten.

Diese Isolate wurden aus zwei *T. hermanni* (V770/95 und V31479/97) und aus einer *Agr. horsfieldii* (1432) isoliert.

Serum-Nr., Spezies, aus denen das Serum gewonnen wurde und gemessener Titer, sind in Tab. 18 aufgelistet. Eine mathematische Auswertung der Antikörpertiter fand nach der vereinfachten Labormethode nach Reed und Muench (MAYR et al., 1974) statt.

Von 21 Seren der Spezies *Agr. horsfieldii* wiesen 17 ausschließlich Antikörper gegen das Virusisolat 1432/94 auf. Vier Tiere hatten zusätzlich Antikörper gegen das Isolat V770/95, bzw. gegen die Isolate V770/95 und V31479/97, wobei diese bei zwei Tieren unterhalb der gewählten Spezifitätsgrenze (Titer ≤ 8) lagen.

Die fünf getesteten Seren der Spezies *T. marginata* enthielten ausschließlich Antikörper gegen die Isolate V770/95 und V31479/97.

Von 10 Seren der Spezies *T. hermanni* wiesen 9 ausschließlich Antikörper gegen die Isolate V770/95 und V31479/97 auf. Das Serum eines Tieres besaß zusätzlich Antikörper gegen das Isolat 1432/94.

11 von 12 Seren, die aus der Spezies *T. graeca* gewonnen wurden, besaßen ausschließlich Antikörper gegen die Isolate V770/95 und V31479/97. Ein Serum enthielt zusätzlich Antikörper gegen das Isolat 1432/94.

Das Serum einer *G. denticulata* wies ebenfalls nur Antikörper gegen die Isolate V770/95 und V31479/97 auf.

Tab. 18: Ergebnisse der Neutralisationstests

Probenanzahl: 49		Virusisolat		
		V770/95	V31479/97	1432/94
Serum-Nr.	Spezies	Titer (KID50)		
485/02	Agr. horsfieldii	0	0	23
492/02	Agr. horsfieldii	0	0	16
530/02	Agr. horsfieldii	4	0	512
583/02	Agr. horsfieldii	0	0	90
609/02	Agr. horsfieldii	0	0	11
642/02	Agr. horsfieldii	0	0	23
697/02	Agr. horsfieldii	0	0	128
708/02	Agr. horsfieldii	6	6	256
781/02	Agr. horsfieldii	0	0	11
790/02	Agr. horsfieldii	0	0	64
854/02	Agr. horsfieldii	16	23	90
855/02	Agr. horsfieldii	90	32	16
856/02	Agr. horsfieldii	8	0	11
859/02	Agr. horsfieldii	0	0	16
860/02	Agr. horsfieldii	0	0	23
985/02	Agr. horsfieldii	0	0	32
1092/02	Agr. horsfieldii	0	0	32
1214/02	Agr. horsfieldii	0	0	32
1636/02	Agr. horsfieldii	0	0	16
1886/02	Agr. horsfieldii	0	0	32
1887/02	Agr. horsfieldii	0	0	90
567/02	T.marginata	64	16	0
1174/02	T.marginata	45	45	0
1177/02	T.marginata	64	45	0
1178/02	T.marginata	23	23	0
1578/01	T.marginata	91	64	0
457/02	T.hermani	23	11	0
465/03	T.hermani	128	23	0
968/02	T.hermani	45	45	0
537/02	T.hermani	256	32	32
566/02	T.hermani	90	128	0
1131/02	T.hermani	23	23	0
1175/02	T.hermani	16	11	0
1220/02	T.hermani	23	23	0
1464/02	T.hermani	23	6	0
1532/02	T.hermani	16	11	0
537/03	T.graeca	256	32	32
593/02	T.graeca	45	64	0
1176/02	T.graeca	91	128	0
1180/02	T.graeca	45	45	0
1181/02	T.graeca	45	32	0
1363/02	T.graeca	16	11	0
1364/02	T.graeca	181	256	0
1367/02	T.graeca	91	32	0
1458/02	T.graeca	11	11	0

4.5 Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA mittels PCR

4.5.1 Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA aus infiziertem Zellkulturüberstand

Die Abb. 73- 84 zeigen die Ergebnisse der PCR 1-3, die mit Landschildkröten-Herpesvirus-DNA aus infiziertem Zellkulturüberstand erzielt wurden.

Ergebnisse der PCR1

Mit der für Landschildkröten-Herpesvirus-DNA spezifischen PCR1 mit den Primern R2 und F2 nach TEIFKE et al. (2000) gelang es, das spezifische Amplifikat von 307 bp bei allen 35 Virusisolaten aus infiziertem Zellkulturüberstand nachzuweisen (Abb. 67-69).

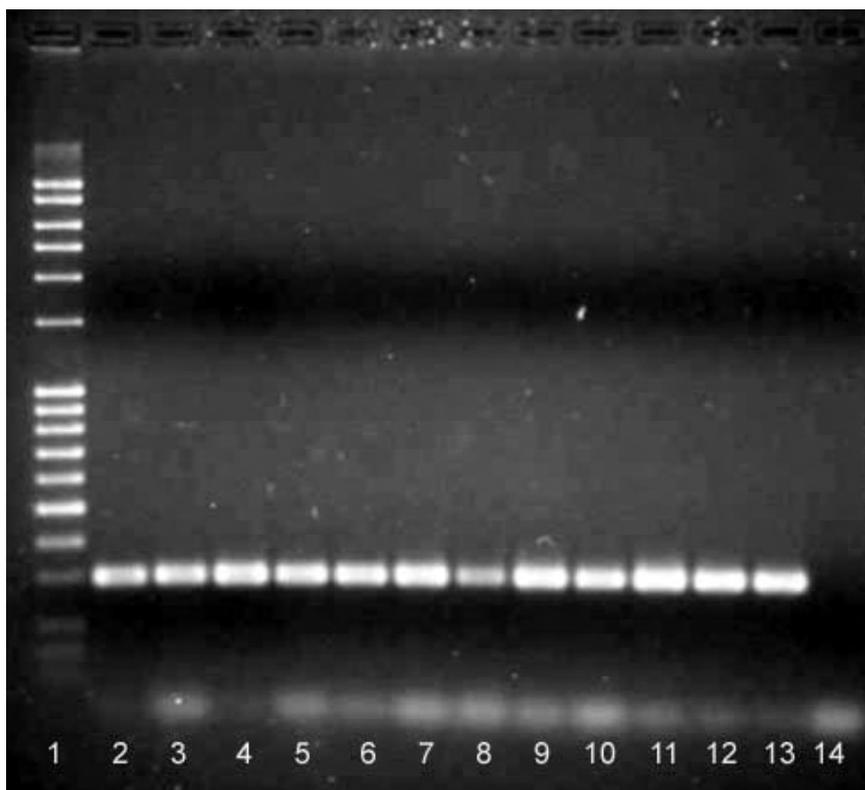


Abb. 67: Ergebnisse PCR1: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17823/97 (Spur 2); V21308/97 (Spur 3); V31479/97 (Spur 4); V7127/98 (Spur 5); V7313/98 (Spur 6); V7392/98 (Spur 7); V7406/98 (Spur 8); V7503/98 (Spur 9); V7736/98 (Spur 10); V8437/98 (Spur 11); V8464/98 (Spur 12); V8465/98 (Spur 13); Negativ-Kontrolle (Spur 14).

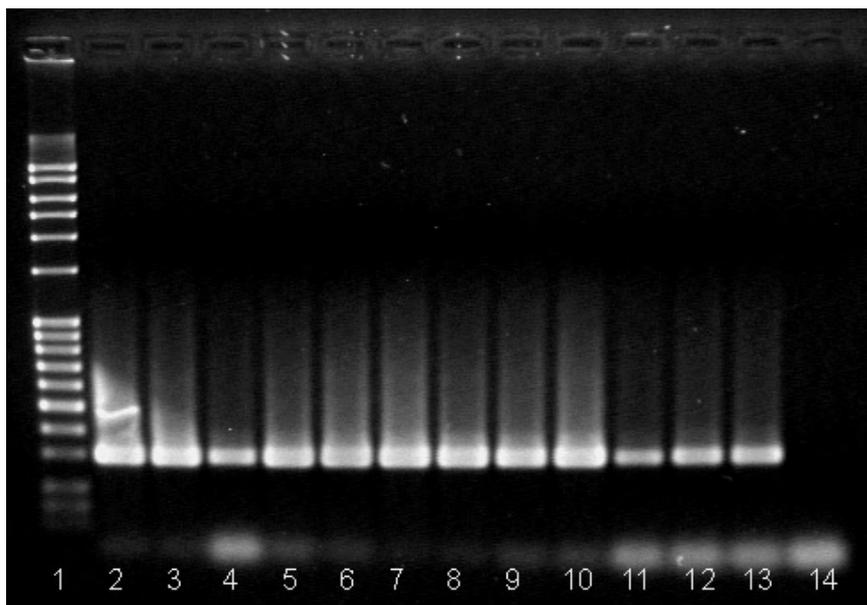


Abb. 68: Ergebnisse PCR1: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V120/99 (Spur 2); V503/99 (Spur 3); V694/99 (Spur 4); V1114/99 (Spur 5); V1568/99 (Spur 6); V1572/99 (Spur 7); V1576/99 (Spur 8); V1577/99 (Spur 9); V1579/99 (Spur 10); V3494/99 (Spur 11); V3577/99 (Spur 12); V3950/99 (Spur 13); Negativ-Kontrolle (Spur 14).

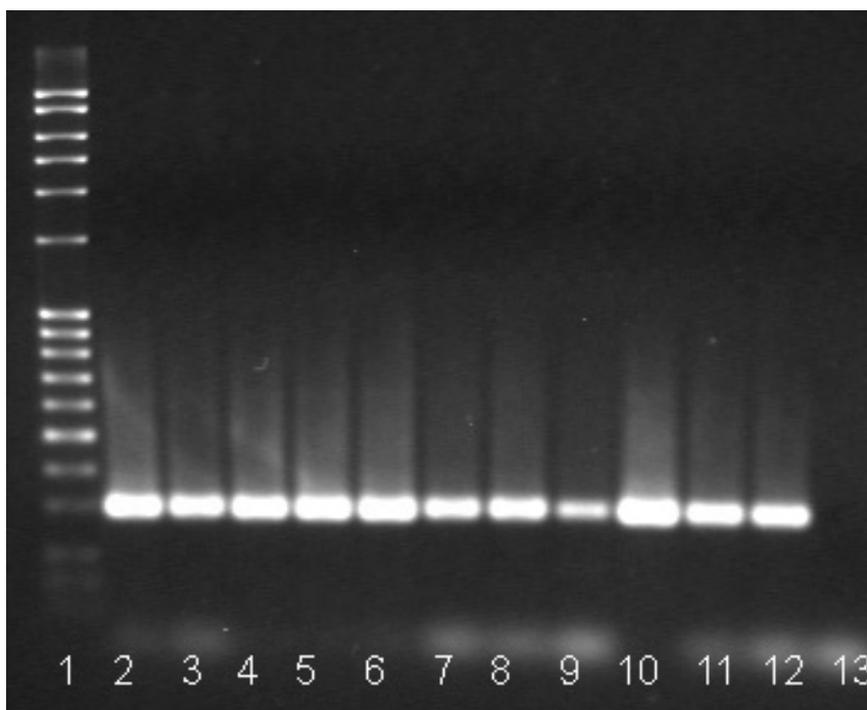


Abb. 69:-Ergebnisse PCR1: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17/97 (Spur 2); V770/95 (Spur 3); 2245/92 (Spur 4); 1432/94 (Spur 5); 4295/7R/95 (Spur 6); 1301/B99R/97 (Spur 7); B/02 (Spur 8); V320/02 (Spur 9); V1261/02 (Spur 10); V1262/02 (Spur 11); V10/03 (Spur 12); Negativ-Kontrolle (Spur 13).

In Bezug auf die Annealing-Temperatur ergaben sich aber unter den Isolaten deutliche Unterschiede. So konnten bei den Isolaten aus der Restriktionsgruppe III im Bereich der untersuchten Annealing-Temperatur von 43-60 °C nur bis zu einer Temperatur von maximal 54,3 °C Amplifikationsprodukte erhalten werden, während bei den übrigen Isolaten ein Primer-Annealing bis zu der untersuchten Höchsttemperatur von 60 °C stattfand (siehe Tab. 19).

Tab. 19: Ergebnisse der PCR1 durchgeführt bei unterschiedlicher Annealing-Temperatur

Virusisolat	Annealing-Temp. mit positiven PCR- Ergebniss
AG17/96	43-60 °C
V770/95	43-60 °C
1432/94	43- 52 °C
2245/92	43-60 °C
4295/7R/95	43-60 °C
1301/B99R/97	43- 52 °C
V17823/97	43-60 °C
V21308/97	43-60 °C
V31479/97	43-60 °C
V7127/98	43-60 °C
V7313/98	43-60 °C
V7392/98	43-60 °C
V7406/98	43-60 °C
V7503/98	43-60 °C
V7736/98	43-60 °C
V8437/98	43-60 °C
V8464/98	43-60 °C
V8465/98	43-60 °C
V120/99	43-60 °C
V503/99	43-60 °C
V694/99	43- 52 °C
V1114/99	43-60 °C
V1568/99	43-60 °C
V1572/99	43-60 °C
V1576/99	43-60 °C
V1577/99	43-60 °C
V1579/99	43-60 °C
V3494/99	43- 48,3 °C
V3577/99	43- 52 °C
V3950/99	43- 49,9 °C
B/02	43- 49,9 °C
V320/02	43- 52 °C
V1261/02	43- 54,3 °C
V1262/02	43- 52 °C
V10/03	43-60 °C

Ergebnisse der PCR2

Mit der für Landschildkröten-Herpesvirus-DNA spezifischen PCR2 mit den Primern nach MURAKAMI et al. (2001) gelang in der Primary PCR mit den Primern U-73

und L-588 der Nachweis des spezifischen Amplifikates von 535 bp aus infiziertem Zellkulturüberstand auch nach Modifizierung der Parameter $MgCl_2$ -Konzentration, Primer-Konzentration und Annealing-Temperatur nur bei den 10 Virusisolaten der Restriktionsgruppe III (Abb. 70-71).

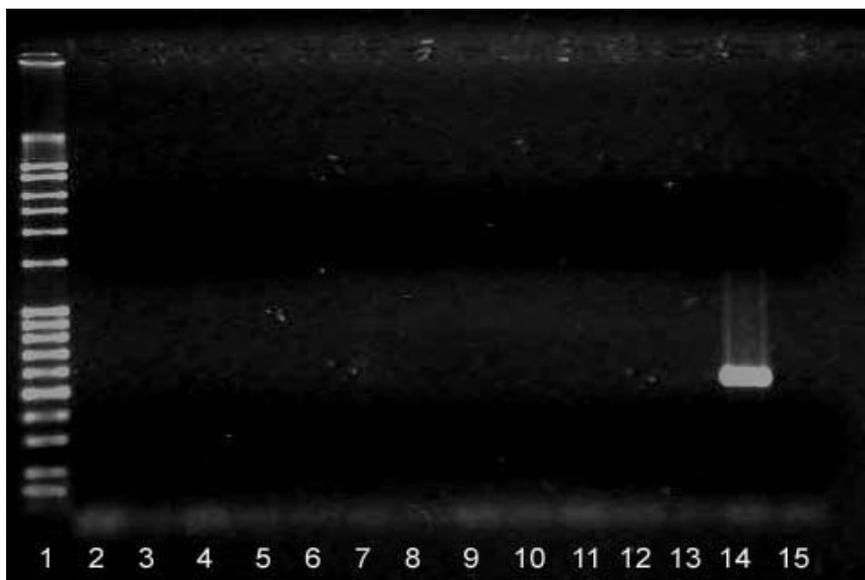


Abb. 70: Ergebnisse der Primary PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17823/97 (Spur 2); V21308/97 (Spur 3); V31479/97 (Spur 4); V7127/98 (Spur 5); V7313/98 (Spur 6); V7392/98 (Spur 7); V7406/98 (Spur 8); V7503/98 (Spur 9); V7736/98 (Spur 10); V8437/98 (Spur 11); V8464/98 (Spur 12); V8465/98 (Spur 13); Positiv-Kontrolle V694/99 (Spur 14); Negativ-Kontrolle (Spur 15).

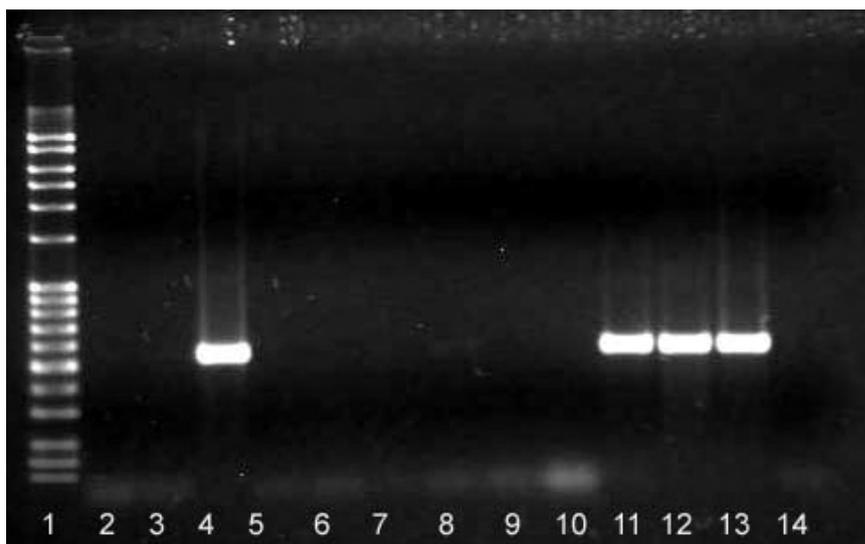


Abb. 71: Ergebnisse der Primary PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V120/99 (Spur 2); V503/99 (Spur 3); V694/99 (Spur 4); V1114/99 (Spur 5); V1568/99 (Spur 6); V1572/99 (Spur 7); V1576/99 (Spur 8); V1577/99 (Spur 9); V1579/99 (Spur 10); V3494/99 (Spur 11); V3577/99 (Spur 12); V3950/99 (Spur 13); Negativ-Kontrolle (Spur 14).

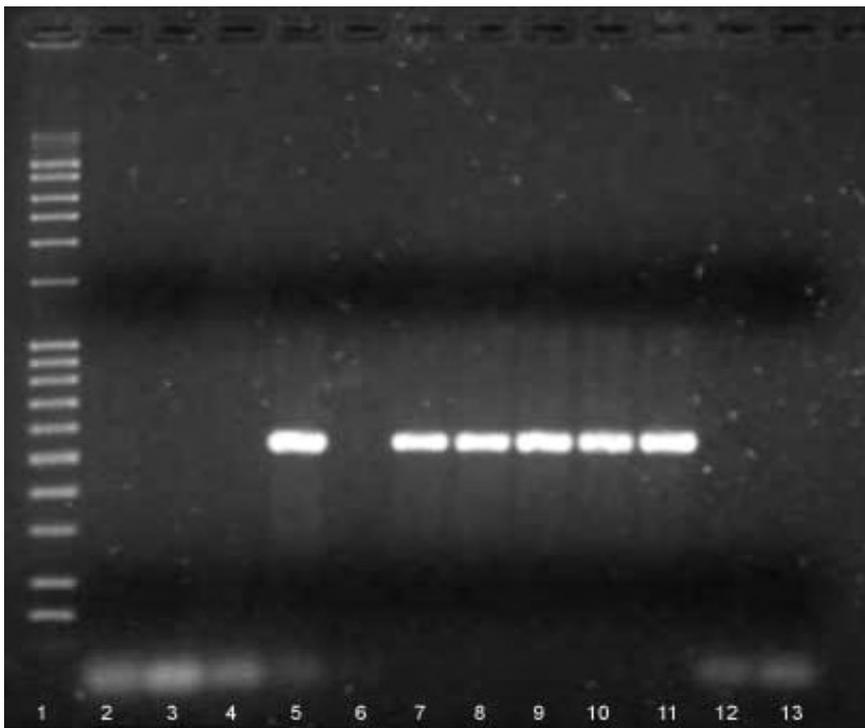


Abb. 72: Ergebnisse der Primary PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17/97 (Spur 2); V770/95 (Spur 3); 2245/92 (Spur 4); 1432/94 (Spur 5); 4295/7R/95 (Spur 6); 1301/B99R/97 (Spur 7); B/02 (Spur 8); V320/02 (Spur 9); V1261/02 (Spur 10); V1262/02 (Spur 11); V10/03 (Spur 12); Negativ-Kontrolle (Spur 13).

Auch in der Secondary PCR2 konnte mit den Primern L-588 und U-289 nur bei diesen Isolaten das spezifische Produkt von 319 bp aus infiziertem Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Abb. 73-75).

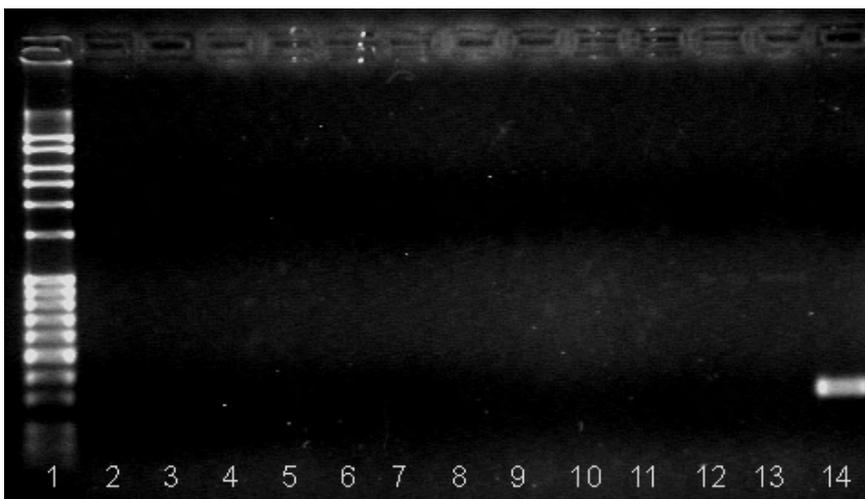


Abb. 73: Ergebnisse der Secondary PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17823/97 (Spur 2); V21308/97 (Spur 3); V31479/97 (Spur 4); V7127/98 (Spur 5); V7313/98 (Spur 6); V7392/98 (Spur 7); V7406/98 (Spur 8); V7503/98 (Spur 9); V7736/98 (Spur 10); V8437/98 (Spur 11); V8464/98 (Spur 12); V8465/98 (Spur 13); Positiv-Kontrolle V694/99 (Spur 14).

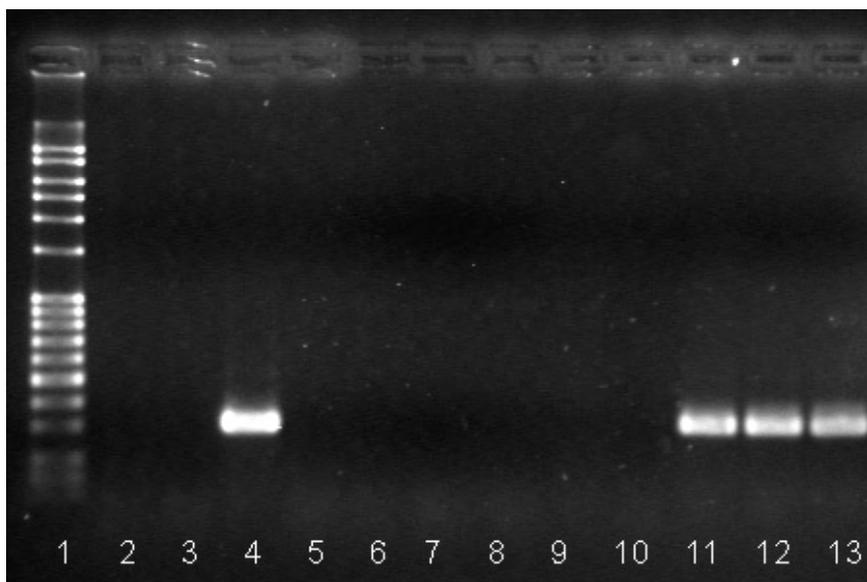


Abb. 74: Ergebnisse der Secondary PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V120/99 (Spur 2); V503/99 (Spur 3); V694/99 (Spur 4); V1114/99 (Spur 5); V1568/99 (Spur 6); V1572/99 (Spur 7); V1576/99 (Spur 8); V1577/99 (Spur 9); V1579/99 (Spur 10); V3494/99 (Spur 11); V3577/99 (Spur 12); V3950/99 (Spur 13).

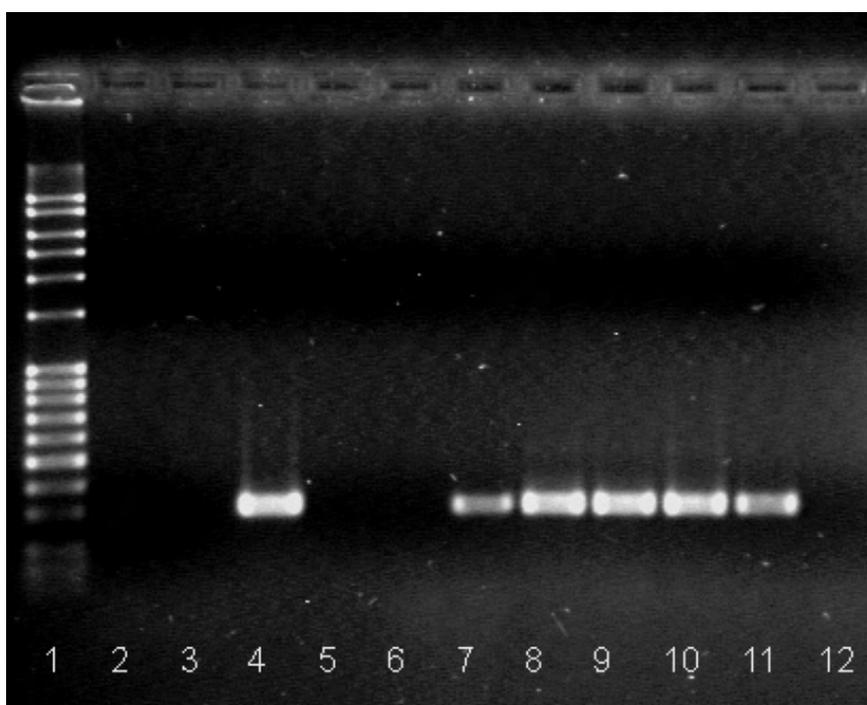


Abb. 75: Ergebnisse der Secondary PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17/97 (Spur 2); V770/95 (Spur 3); 2245/92 (Spur 4); 1432/94 (Spur 5); 4295/7R/95 (Spur 6); 1301/B99R/97 (Spur 7); B/02 (Spur 8); V320/02 (Spur 9); V1261/02 (Spur 10); V1262/02 (Spur 11); V10/03 (Spur 12).

Ergebnisse der PCR3

Mit der spezifischen PCR für diverse Herpesviren (PCR3) mit den degenerierten Primern nach VAN DEVANTER et al. (1996) gelang es in der Secondary PCR mit den Primern TGV und IYG bei allen 35 Virusisolaten, das spezifische Amplifikat nachzuweisen (Abb. 76-78). Die Sequenzierung des DNA-Produkts der Isolate V770/95, 1432/94 und V31479/97 ergab bei allen drei Amplifikaten eine spezifische Länge von 234 bp. In der Primary PCR konnten mit den Primern DFA, ILK und KG1 nur undeutliche oder gar keine Amplifikate nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

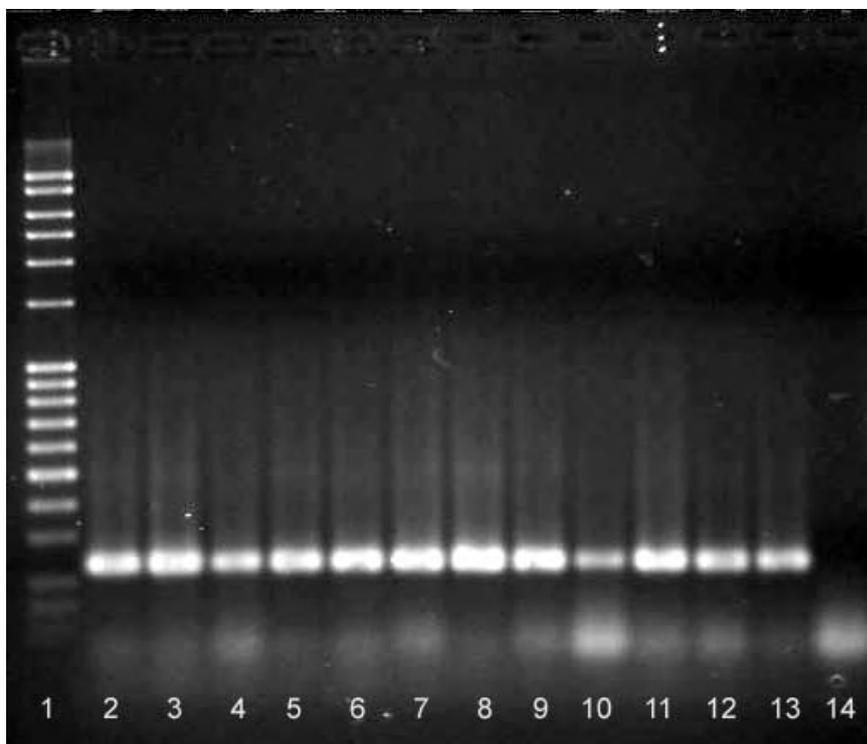


Abb. 76: Ergebnisse der Secondary PCR3: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17823/97 (Spur 2); V21308/97 (Spur 3); V31479/97 (Spur 4); V7127/98 (Spur 5); V7313/98 (Spur 6); V7392/98 (Spur 7); V7406/98 (Spur 8); V7503/98 (Spur 9); V7736/98 (Spur 10); V8437/98 (Spur 11); V8464/98 (Spur 12); V8465/98 (Spur 13); Negativ-Kontrolle (Spur 14).

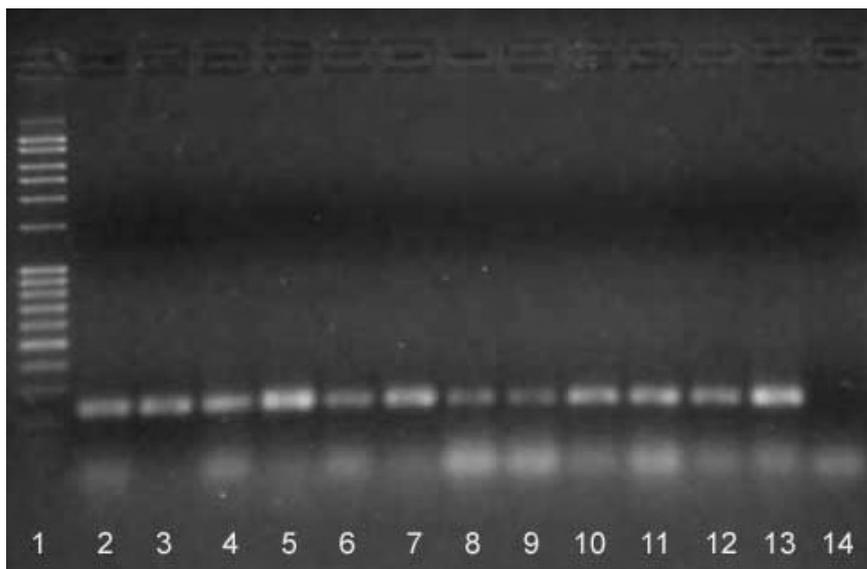


Abb. 77: Ergebnisse der Secondary PCR3: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V120/99 (Spur 2); V503/99 (Spur 3); V694/99 (Spur 4); V1114/99 (Spur 5); V1568/99 (Spur 6); V1572/99 (Spur 7); V1576/99 (Spur 8); V1577/99 (Spur 9); V1579/99 (Spur 10); V3494/99 (Spur 11); V3577/99 (Spur 12); V3950/99 (Spur 13); Negativ-Kontrolle (Spur 14).

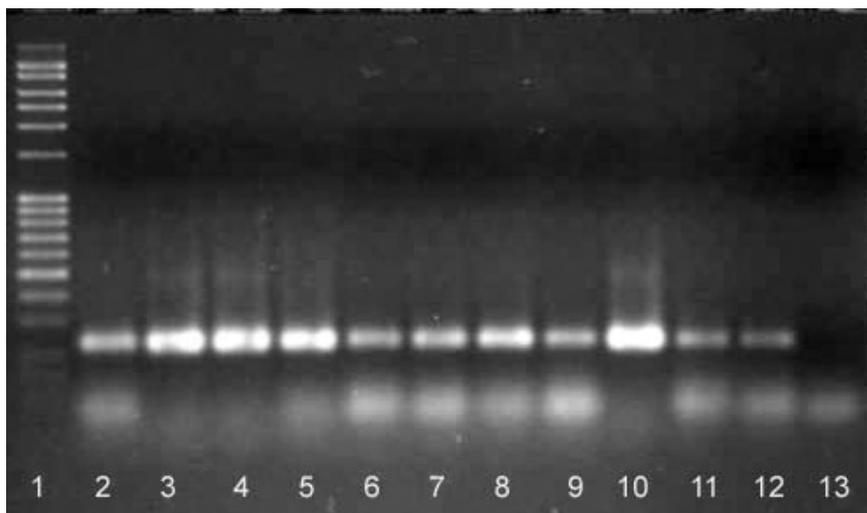


Abb. 78: Ergebnisse der Secondary PCR3: DNA-Marker P-815 (Spur 1); V17/97 (Spur 2); V770/95 (Spur 3); 2245/92 (Spur 4); 1432/94 (Spur 5); 4295/7R/95 (Spur 6); 1301/B99R/97 (Spur 7); B/02 (Spur 8); V320/02 (Spur 9); V1261/02 (Spur 10); V1262/02 (Spur 11); V10/03 (Spur 12); Negativ-Kontrolle (Spur 13).

4.5.2 Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA aus Organmaterial

Ergebnisse der PCR1

Mit der für Landschildkröten-Herpesvirus-DNA spezifischen PCR1 mit den Primern R2 und F2 nach TEIFKE et al. (2000) wurde bei 33 von 67 Organproben und bei 5 von 7 Rachentupferproben herpesvirale DNA nachgewiesen.

Tab. 20 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse, die mit der PCR1 erzielt wurden.

Tab. 20: Ergebnisse PCR1

Isolat-Nr.	Organ- und Tupferproben (Total 74 Proben)		Virushaltiger Zellkulturüberstand	
	PCR-positiv	PCR-negativ	PCR-positiv	PCR-negativ
V17/97	—	—	x	
V770/95	—	—	x	
1432/94	—	—	x	
2245/92	—	—	x	
4295/7R/95	—	—	x	
1301/B99R/97	—	—	x	
V17 823/97	Zu	Lu, Le	x	
V21 308/97	Zu	Le	x	
V31 479/97		Organprobe	x	
V7127/98	Zu	Le, Da	x	
V7313/98	Organprobe		x	
V7392/98		R	x	
V7406/98	Zu	Lu, Ge, He, Le, Ni, Foll, Ut	x	
V7503/98	R		x	
V7736/98	Zu, Ge	Lu, Le, Ni, Foll	x	
V8437/98	—	—	x	
V8464/98	Ge	Lu, Le, Da	x	
V8465/98	Zu, Ni, Da	Lu, Le	x	
V120 /99	R		x	
V503/99	Da, Zu	Le, Ni	x	
V694/99	Zu, Trach, Lu	Ge, Le, Ni	x	
V1114/99	Zu, Lu, Da		x	
V1568/99	Organprobe		x	
1 572/99	Zu, Kehlk	Trach, Lu	x	
V1576/99	Zu, Kehlk, Trach, Lu		x	
V1577/99	Zu, Kehlk, Trach	Lu	x	
V1579/99	Zu	Lu	x	
V3494/99	Zu, Lu	Trach	x	
V3577/99	—	—	x	
V3950/99	—	—	x	
B/02		R	x	
V320/02	R		x	
V1261/02	R		x	
V1262/02	R		x	
V10/03	Zu	Lu, Le	x	

Da = Darm; Foll = Follikel; Ge = Gehirn; He = Herz; Kehlk = Kehlkopf; Le = Leber; Lu = Lunge; Ni = Niere; Organprobe = Mischung aus mehreren Organen; R = Rachentupfer; Trach = Trachea; Ut = Uterus; x = positives Ergebnis; Zu = Zunge; — = kein Material vorhanden

Ergebnisse der PCR2

In der für Landschildkröten-Herpesvirus spezifischen PCR2 mit den Primern nach MURAKAMI et al. (2001) konnten in der Primary PCR mit den Primern U-73 und L-588 bei 9 von 67 Organproben und bei 4 von 7 Rachentupferproben Herpesvirus-DNA in Form des spezifischen Amplifikates von 535 bp nachgewiesen werden. Es handelte sich ausschließlich um Proben, die von Isolaten stammten, die der Restriktionsgruppe III zugeordnet wurden.

Auch in der Secondary PCR, in der das Produkt der Primery PCR als Substrat für die Primer L-588 und U-289 eingesetzt wurde, konnte das spezifische Amplifikat von 319 bp nur bei diesen Organ- und Tupferproben erhalten werden.

Tab. 21 und 22 geben eine Übersicht über die Ergebnisse, die mit der PCR2 erzielt wurden.

Tab. 21: Ergebnisse Primary PCR2

Isolat-Nr.	Organ- und Tupferproben (Total 74 Proben)		Virushaltiger Zellkulturüberstand	
	PCR-positiv	PCR-negativ	PCR-positiv	PCR-negativ
V17/97	—	—		x
V770/95	—	—		x
1432/94	—	—	x	
2245/92	—	—		x
4295/7R/95	—	—		x
1301/B99R/97	—	—	x	
V17 823/97		Zu, Lu, Le		x
V21 308/97		Zu, Le		x
V31 479/97		Organprobe		x
V7127/98		Zu, Le, Da		x
V7313/98		Organprobe		x
V7392/98		R		x
V7406/98		Zu, Lu, Ge, He,Le, Ni, Foll, Ut		x
V7503/98		R		x
V7736/98		Zu, Lu,Ge, Le, Ni, Foll		x
V8437/98	—	—		x
V8464/98		Lu, Ge, Le, Da		x
V8465/98		Zu, Lu, Le, Ni, Da		x
V120 /99		R		x
V503/99		Zu, Le, Ni, Da		x
V694/99	Zu, Trach, Lu, Ge,Le, Ni		x	
V1114/99		Zu, Lu, Da		x
V1568/99		Organprobe		x
1 572/99		Zu, Lu, Kehlk, Trach		x
V1576/99		Zu, Kehlk, Trach, Lu		x
V1577/99		Zu, Kehlk, Trach, Lu		x
V1579/99		Zu, Lu		x
V3494/99	Zu, Trach, Lu		x	
V3577/99	—	—	x	
V3950/99	—	—	x	
B/02	R		x	
V320/02	R		x	
V1261/02	R		x	
V1262/02	R		x	
V10/03		Zu, Lu, Le		x

Da = Darm; Foll = Follikel; Ge = Gehirn; He = Herz; Kehlk = Kehlkopf; Le = Leber; Lu = Lunge; Ni = Niere; Organprobe = Mischung aus mehreren Organen; R = Ra-
 chentupfer; Trach = Trachea; Ut = Uterus; x = positives Ergebnis; Zu = Zunge; —
 = kein Material vorhanden

Tab. 22: Ergebnisse der Secondary PCR2

Isolat-Nr.	Organ- und Tupferproben (Total 74 Proben)		Virushaltiger Zellkulturüberstand	
	PCR-positiv	PCR-negativ	PCR-positiv	PCR-negativ
V17/97	—	—		x
V770/95	—	—		x
1432/94	—	—	x	
2245/92	—	—		x
4295/7R/95	—	—		x
1301/B99R/97	—	—	x	
V17 823/97		Zu, Lu, Le		x
V21 308/97		Zu, Le		x
V31 479/97		Organprobe		x
V7127/98		Zu, Le, Da		x
V7313/98		Organprobe		x
V7392/98		R		x
V7406/98		Zu, Lu, Ge, He, Le, Ni, Foll, Ut		x
V7503/98		R		x
V7736/98		Zu, Lu, Ge, Le, Ni, Foll		x
V8437/98	—	—		x
V8464/98		Lu, Le, Ge, Da		x
V8465/98		Zu, Lu, Le, Ni, Da		x
V120 /99		R		x
V503/99		Zu, Le, Ni, Da		x
V694/99	Zu, Trach, Lu, Ge, Le, Ni		x	
V1114/99		Zu, Lu, Da		x
V1568/99		Organprobe		x
1 572/99		Zu, Lu, Kehlk, Trach		x
V1576/99		Zu, Kehlk, Trach, Lu		x
V1577/99		Zu, Kehlk, Trach, Lu		x
V1579/99		Zu, Lu		x
V3494/99	Zu, Trach, Lu		x	
V3577/99	—	—	x	
V3950/99	—	—	x	
B/02	R		x	
V320/02	R		x	
V1261/02	R		x	
V1262/02	R		x	
V10/03		Zu, Lu, Le		x

Da = Darm; Foll = Follikel; Ge = Gehirn; He = Herz; Kehlk = Kehlkopf; Le = Leber; Lu = Lunge; Ni = Niere; Organprobe = Mischung aus mehreren Organen; R = Rachentupfer; Trach = Trachea; Ut = Uterus; x = positives Ergebnis; Zu = Zunge; — = kein Material vorhanden

Ergebnisse der PCR3

In der Secondary PCR3 nach VAN DEVANTER et al. (1996) konnten mit den Primern TGV und IYG das spezifische Amplifikat von 181 bp bei 54 von 67 Organproben und bei allen 7 Rachentupferproben nachgewiesen werden. In der Primary

PCR3 mit den Primern DFA, ILK und KG1, deren Produkt als Substrat für die Secondary PCR diente, war das spezifische Amplifikat nicht oder nur undeutlich sichtbar.

Tab. 23 gibt eine Übersicht über die Ergebnisse, die in der Secondary PCR3 erzielt wurden.

Tab. 23: Ergebnisse der Secondary PCR3

Isolat-Nr.	Organ- und Tupferproben (Total 74 Proben)		Virushaltiger Zellkulturüberstand	
	PCR-positiv	PCR-negativ	PCR-positiv	PCR-negativ
V17/97	—	—	x	
V770/95	—	—	x	
1432/94	—	—	x	
2245/92	—	—	x	
4295/7R/95	—	—	x	
1301/B99R/97	—	—	x	
V17 823/97	Zu, Lu, Le		x	
V21 308/97	Zu, Le		x	
V31 479/97	Organprobe		x	
V7127/98	Zu	Le, Da	x	
V7313/98	Organprobe		x	
V7392/98	R		x	
V7406/98	Zu, Ge, Ni	Lu, He, Le, Foll, Ut	x	
V7503/98	R		x	
V7736/98	Zu, Lu, Ge	Le, Ni, Foll	x	
V8437/98	—	—	x	
V8464/98	Lu, Ge, Da	Le	x	
V8465/98	Zu, Lu, Ni	Le, Da	x	
V120 /99	R		x	
V503/99	Zu, Le, Da	Ni	x	
V694/99	Zu, Trach, Lu, Ge, Le, Ni		x	
V1114/99	Zu, Lu, Da		x	
V1568/99	Organprobe		x	
1 572/99	Zu, Kehlk, Trach	Lu	x	
V1576/99	Zu, Kehlk, Trach, Lu		x	
V1577/99	Zu, Kehlk, Trach, Lu		x	
V1579/99	Zu, Lu		x	
V3494/99	Zu, Trach, Lu		x	
V3577/99	—	—	x	
V3950/99	—	—	x	
B/02	R		x	
V320/02	R		x	
V1261/02	R		x	
V1262/02	R		x	
V10/03	Zu	Lu, Le	x	

Da = Darm; Foll = Follikel; Ge = Gehirn; He = Herz; Kehlk = Kehlkopf; Le = Leber; Lu = Lunge; Ni = Niere; Organprobe = Mischung aus mehreren Organen; R = Rachen-
tupfer; Trach = Trachea; Ut = Uterus; x = positives Ergebnis; Zu = Zunge; — = kein Material vorhanden

4.5.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur Spezifität der durchgeführten PCRs

Mit den Primern R2 und F2 der PCR1 konnten bei keinem Herpesvirus-Isolat, welches nicht aus Landschildkröten isoliert wurde, ein positiver PCR-Nachweis in Form eines spezifischen Amplifikates erbracht werden. Auch bei den Viren anderer Virusfamilien, Mykoplasmen-Isolaten und bei der nicht infizierten TH-Zellkultur fiel der PCR-Nachweis negativ aus (Abb. 79).

Mit der PCR2 konnte weder in der Primary PCR2 mit den Primern U-73 und L-588, noch in der Secondary PCR2 mit den Primern U-289 und L-588 bei den getesteten Isolaten, die nicht aus Landschildkröten isoliert wurden und in der nicht-infizierten TH-Zellkultur ein charakteristisches Amplifikat erhalten werden (Abb. 80 und 81).

Mit der PCR3 konnte in der Secondary PCR mit den Primern TGV und IYG ein positiver DNA-Nachweis in Form des spezifischen Amplifikates bei dem SHV1-, EHV1- und EHV4-Isolat erzielt werden.

Das Amplifikat, welches aus einem BHV1-Isolat erhalten wurde, war in seiner Größe geringförmig aber doch deutlich erkennbar kleiner als die spezifischen Amplifikate der Landschildkröten-Herpesviren, die als Positiv-Kontrolle mitgeführt wurden.

Alle anderen Isolate, die nicht zu der Familie der Herpesviren gehören und die nicht infizierte TH-Zellkultur waren in der PCR negativ (Abb. 82).

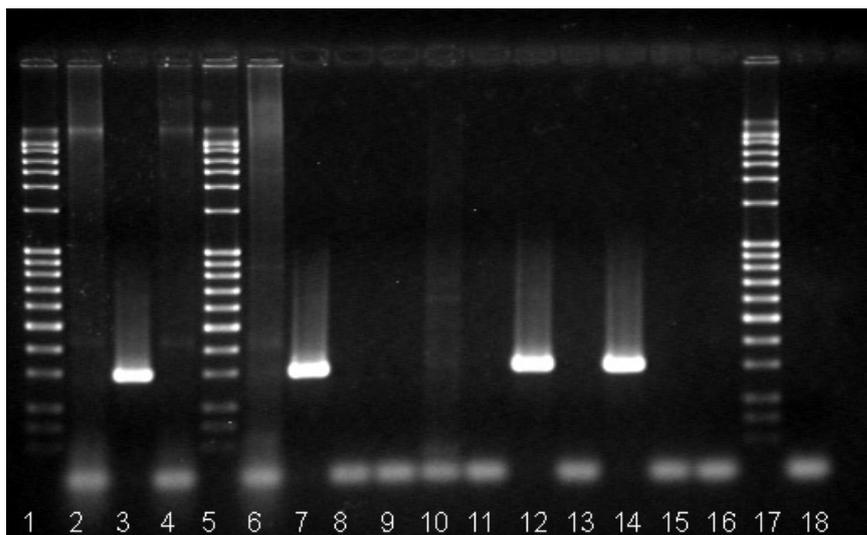


Abb. 79: Ergebnisse der Spezifitätsprüfung, PCR1: DNA-Marker P-815 (Spur 1); Suid Herpesvirus-1 (Spur 2); 4295/7R/95 (Spur 3); Bovines Herpesvirus-1 (Spur 4); DNA-Marker P-815 (Spur 5); Equines Herpesvirus-1 (Spur 6); 4295/7R/95 (Spur 7); Equines Herpesvirus-4 (Spur 8); Reovirus (Spur 9); Chlamydomphila psittaci (Spur 10); Paramyxovirus (Spur 11); 4295/7R/95 (Spur 12); Iridovirus (Spur 13); 4295/7R/95 (Spur 14); TH-Zellen (Spur 15); Mycoplasma agassizii (Spur 16); DNA-Marker P-815 (Spur 17); Negativ-Kontrolle (Spur 18).

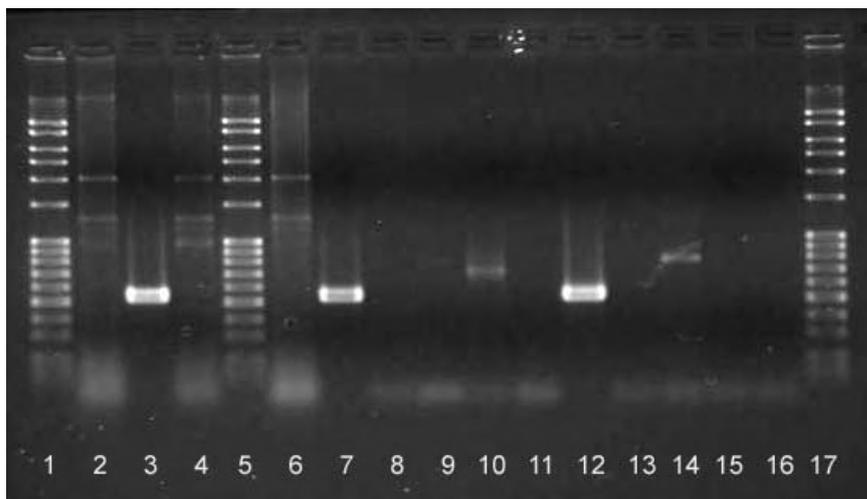


Abb. 80: Ergebnisse der Spezifitätsprüfung, Primary-PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); Suid Herpesvirus-1 (Spur 2); V694/99 (Spur 3); Bovines Herpesvirus-1 (Spur 4); DNA-Marker P-815 (Spur 5); Equines Herpesvirus-1 (Spur 6); V694/99 (Spur 7); Equines Herpesvirus-4 (Spur 8); Reovirus (Spur 9); Chlamydomphila psittaci (Spur 10); Paramyxovirus (Spur 11); V694/99 (Spur 12); Iridovirus (Spur 13); Mycoplasma agassizii (Spur 14); TH-Zellen (Spur 15); V4295/7R/95 (Spur 16); DNA-Marker P-815 (Spur 17).

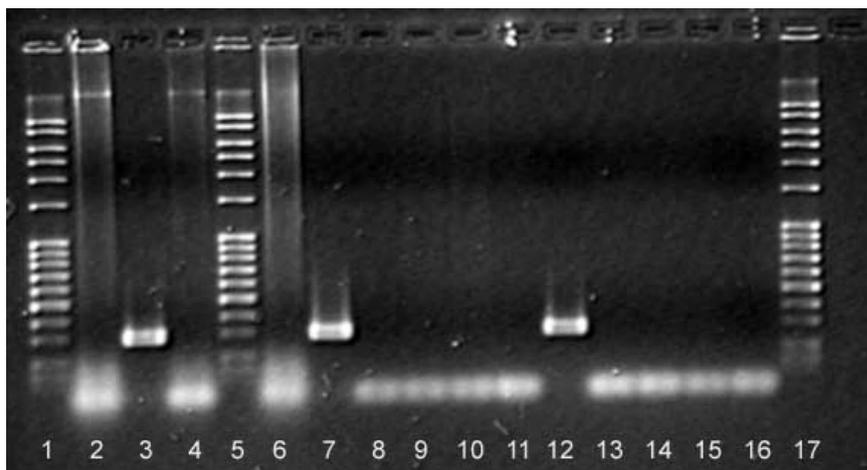


Abb. 81: Ergebnisse der Spezifitätsprüfung, Secondary-PCR2: DNA-Marker P-815 (Spur 1); Suid Herpesvirus-1 (Spur 2); V694/99 (Spur 3); Bovines Herpesvirus-1 (Spur 4); DNA-Marker P-815 (Spur 5); Equines Herpesvirus-1 (Spur 6); V694/99 (Spur 7); Equines Herpesvirus-4 (Spur 8); Reovirus (Spur 9); Chlamydomphila psittaci (Spur 10); Paramyxovirus (Spur 11); V694/99 (Spur 12); Iridovirus (Spur 13); Mycoplasma agassizii (Spur 14); TH-Zellen (Spur 15); 4295/7R/95 (Spur 16); DNA-Marker P-815 (Spur 17).

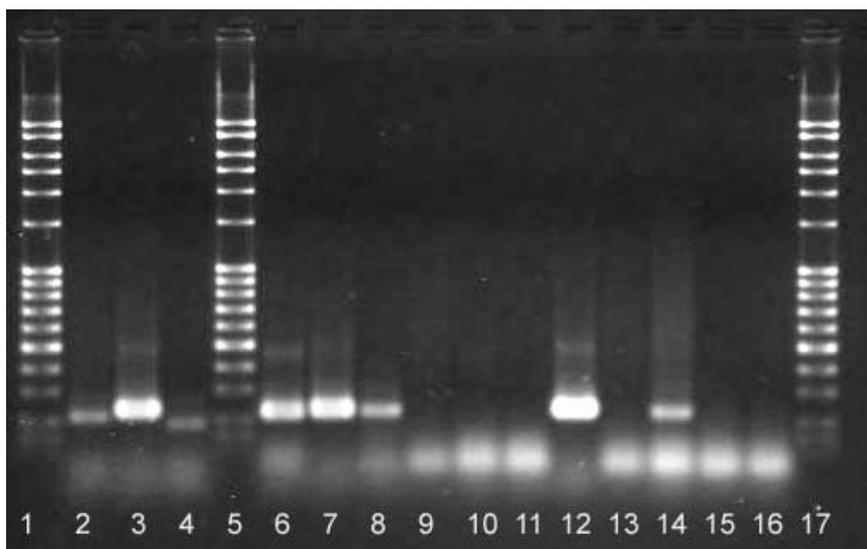


Abb. 82: Ergebnisse der Spezifitätsprüfung, Secondary-PCR3: DNA-Marker P-815 (Spur 1); Suid Herpesvirus-1 (Spur 2); 4295/7R/95 (Spur 3); Bovines Herpesvirus-1 (Spur 4); DNA-Marker P-815 (Spur 5); Equines Herpesvirus-1 (Spur 6); 4295/7R/95 (Spur 7); Equines Herpesvirus-4 (Spur 8); Reovirus (Spur 9); Chlamydomphila psittaci (Spur 10); Paramyxovirus (Spur 11); 4295/7R/95 (Spur 12); Iridovirus (Spur 13); V694/99 (Spur 14); TH-Zellen (Spur 15); Mykoplasma agassizii (Spur 16); DNA-Marker P-815 (Spur 17).

5 Diskussion

Seit Ende der 70er Jahre beschäftigt die Herpesvirose der Landschildkröten Tierhalter, Wissenschaftler und Tierärzte. Zunächst stand die klinische und pathologisch-anatomische Beschreibung des Krankheitsbildes, bzw. der histologische und elektronenmikroskopische Virusnachweis im Vordergrund (HOLT und COOPER, 1976; HARPER et al., 1982; JACOBSON et al., 1985; COOPER et al., 1988; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; BRAUNE et al., 1989; LANGE et al., 1989). Dann wandte sich das Interesse der weiteren Differenzierung dieses noch weitgehend unbekanntes Herpesvirus zu, was durch die 1993 von BIERMANN und BLAHAK entwickelte Möglichkeit begünstigt wurde, das Virus auf Zellkulturen zu vermehren, so dass es für weitergehende Untersuchungen zur Verfügung stand.

Bisher war die Frage noch nicht ausreichend geklärt, ob es sich bei dem Erreger um eine homogene Gruppe handelt oder ob sich molekularbiologische und immunologische Unterschiede finden lassen. In vorangegangenen Untersuchungen waren lediglich zwei Isolate gefunden worden, die sich in ihrem Restriktionsendonukleasen-Muster (MARSCHANG, 2000; MARSCHANG et al., 2001a) bzw. serologisch (BIERMANN, 1995; MARSCHANG, 2000) von den übrigen untersuchten Isolaten unterschieden.

Um einen Beitrag zur Lösung dieser Frage zu leisten, wurden Virusisolate und Serumproben von unterschiedlichen Landschildkröten-Spezies durch Restriktionsendonukleasen-Analyse und Serumneutralisationstests miteinander verglichen.

Aufgrund der in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse, kann es als gesichert angesehen werden, dass innerhalb der Herpesviren bei Landschildkröten unterschiedliche Serogruppen existieren, die sich auch durch ihr Restriktionsendonukleasen-Muster deutlich unterscheiden lassen.

In den letzten Jahren wurden eine Reihe von PCR-Protokollen mit Primern aus unterschiedlichen Genom-Abschnitten veröffentlicht, die zum Nachweis von Landschildkröten Herpesvirus-DNA verwendet wurden. Die hier durchgeführten Sensitivitäts- und Spezifitätsprüfungen wiesen nach, dass sich nicht alle Primer für den Nachweis der beiden Serotypen eignen.

Durch die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse wird die labordiagnostische Sicherheit sowohl durch die Anwendung verschiedener Virustypen als Antigene in der Serologie als auch durch Verwendung geeigneter Primer beim molekularbiologischen Virus-DNA-Nachweis deutlich erhöht.

5.1 Virusidentifikation und -differenzierung mit Restriktionsendonukleasen

Eine Chloroform-Behandlung und Kultivierung mit IUDR der Virusisolate führte zu einem Verlust der Infektiosität und zeigte, dass es sich um ein DNA-Virus mit lipidhaltiger Hülle handelt. Die Vermehrung auf TH-Zellkultur ergab bei allen Isolaten einen für viele Herpesviren charakteristischen Rundzell-cpE (MODROW et al., 2003). Auch die elektronenmikroskopische Untersuchung ergab den Nachweis von Herpesvirus-ähnlichen Partikeln, so dass die Schlussfolgerung getroffen werden konnte, dass es sich bei allen Isolaten um Vertreter der Gruppe der Herpesviren handelte.

Nachfolgend wurden die DNA der Herpesvirus-Isolate durch die Restriktionsendonukleasen BamH I, Hind III und Sal I gespalten und anhand des entstandenen Bandenmusters miteinander verglichen.

Dabei ergaben sich drei Gruppen von Isolaten (Restriktionsgruppen I-III), deren Bandenmuster sich innerhalb der Gruppen stark ähnelten, aber deutliche Unterschiede zu den beiden übrigen Restriktionsgruppen zeigten.

Kein Isolat wies ein identisches Bandenmuster zu einem anderen auf, auch nicht, wenn es sich um Isolate aus dem selben Bestand und dem selben Krankheitsausbruch handelte. Unterschiede innerhalb der Restriktionsgruppen traten auf in Form von meist geringgradigen Größenunterschieden zwischen einzelnen Banden und fehlenden bzw. zusätzlich auftretenden Fragmenten. Diese Beobachtung deckt sich mit der von MARSCHANG (2000), die bei ähnlichen Untersuchungen ebenfalls geringgradige Unterschiede zwischen dem Restriktionsendonukleasen-Muster von Landschildkröten-Herpesviren aus einem Bestand fand. Da eine einzelne Basenänderung oder Methylierung eine ursprünglich vorhandene Spaltstelle vor dem Abbau der Restriktionsendonuklease schützen kann und Deletionen und Insertionen während der Virus-Replikation zu unterschiedlichen Fragmentgrößen führen, können einzelne Bandenunterschiede nicht als gravierender Unterschied zwischen zwei Isolaten interpretiert werden und werden auf *in vitro* und *in vivo*

Passagen zurückgeführt (ALLEN et al., 1983; ROIZMAN und TOGNON, 1983; GRAIL und HARBOUR, 1990; GÜNTHER, 1995; PRATELLI et al., 2000).

MARSCHANG (2000) und MARSCHANG et al. (2001a) hatten bei 16 durch Restriktionsendonukleasen-Analyse miteinander verglichenen Herpesvirus-Isolaten ein Isolat (1301/B99R/97) aus einer *Agr. horsfieldii* gefunden, welches sich in seinem Bandenmuster von den anderen deutlich unterschied. Bei den in meiner Arbeit miteinander verglichenen Landschildkröten-Herpesviren wurden 9 weitere Isolate gefunden, die vom Restriktionsendonukleasen-Muster her eine hohe Ähnlichkeit mit diesem Isolat 1301/B99R/97 besaßen, darunter auch das Isolat 1432/94, das BIERMANN (1995) in seiner Dissertation untersucht hatte. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass diese 9 Isolate, die alle in Restriktionsgruppe III eingeteilt wurden, ebenfalls aus der Spezies *Agr. horsfieldii* stammten und Isolate aus dieser Spezies wiederum von ihrem Bandenmuster her in keiner der anderen von mir gefundenen Restriktionsgruppen (Restriktionsgruppe I und II) vertreten waren.

Daneben konnten noch drei weitere Isolate gefunden werden, die sich in ihrem Bandenmuster sehr ähnelten, sich aber von den anderen Restriktionsgruppen in den meisten Fragmenten unterschieden. Diese Isolate wurden aus der Spezies *T. hermanni* (V31479/97), *M. emys emys* (V7392/98) und *T. graeca* (V7503/98) isoliert.

5.2 Beziehung zwischen Restriktionsendonukleasen-Muster und Antikörper-Bildung

Um zu testen, ob die Isolate, die aufgrund ihres Spaltmusters in unterschiedliche Restriktionsgruppen (Restriktionsgruppen I-III) eingeteilt wurden, sich auch serologisch unterscheiden, wurde je ein Isolat aus jeder der drei Gruppen als Testvirus im Serum-Neutralisationstest eingesetzt (V770/95 aus Restriktionsgruppe I, V31479/97 aus Restriktionsgruppe II und 1432/94 aus Restriktionsgruppe III) und die Seren von 49 Landschildkröten von fünf verschiedenen Spezies auf Antikörper gegen diese Isolate getestet.

Hier verhielten sich die Seren der Spezies *Agr. horsfieldii* größtenteils anders als die Seren der vier anderen getesteten Spezies. So besaßen 17 der 21 Tiere ausschließlich Antikörper gegen das Antigen 1432/94 und die Antikörper von zwei Tieren lagen bei dem Antigen V770/95 und V31479/97 unter der Spezifitätsgrenze von \leq Titer 8.

Die Seren der anderen Landschildkröten Spezies wiesen dagegen zum größten Teil nur Antikörper gegen die Isolate V770/95 und V31479/97 auf. Ausnahmen waren das Serum einer *T. hermanni* und einer *T. graeca*, die zusätzlich Antikörper gegen das Isolat 1432/94 hatten (siehe Tab. 18).

Die Titerhöhen gegen die Isolate V770/95 und V31479/97 aus Restriktionsgruppe I und II waren zwar in den wenigsten Fällen identisch, lagen aber mit einer Ausnahme beide über der Spezifitätsgrenze. So ist nicht davon auszugehen, dass es sich bei den Isolaten dieser beiden Restriktionsgruppen um zwei verschiedene Serotypen handelt. In diesen beiden Gruppen konnte auch keine Beziehung zwischen dem Restriktionsendonukleasen-Muster und der Spezies aus der die Isolate gewonnen wurden, hergestellt werden.

Offensichtlich existieren somit unter Landschildkröten-Herpesviren zwei verschiedene Serotypen (Serotyp V770/05 und Serotyp 1432/94), wobei die Isolate des Serotyps V770/95 zu den Restriktionsgruppen I und II gehören und die Isolate des Serotyps 1432/94 in Restriktionsgruppe III eingeordnet wurden. Diese immunologischen Unterschiede könnten einen Hinweis auf das Vorhandensein selbstständiger Subspezies sein (ROLLE und MAYR, 2002). Darauf deutet auch die Tatsache hin, dass sich die Isolate der beiden Serotypen auch in der Restriktionsendonukleasen-Analyse unterschieden, da diese Methode ebenfalls zur Unterscheidung von Herpesvirustypen und -subtypen genutzt wird (ARENS und SWIERKOSZ, 1983; ROIZMAN und TOGNON, 1983; PIDONE et al., 1999; D'ARCE et al., 2002). MARSCHANG (2000) äußerte die Vermutung, bei einem ihrer untersuchten Isolate (Isolat 1301/B99R/97) könne es sich mindestens um einen neuen Subtyp handeln, da es sich in seinem Restriktionsendonukleasen-Muster, in seiner Morbiditäts- und Mortalitätsrate und serologisch von den anderen untersuchten Herpesviren unterschieden hatte. Für eine endgültige taxonomische Aussage müssten aber weitere Informationen über das biologische Verhalten und über das

Genom berücksichtigt werden (MINSON et al., 2000). Diese sind zur Zeit noch nicht ausreichend vorhanden, so dass hier noch weiterer Forschungsbedarf besteht.

Die Isolate der Restriktionsgruppe III stammten ausschließlich aus Tieren der Spezies *Agr. horsfieldii*, genau wie der Großteil der getesteten Seren, die Antikörper gegen den Serotyp 1432/94 besaßen. Diese Beobachtung könnte ihre Erklärung in einer höheren Empfänglichkeit dieser Spezies für dieses Virus finden. Es wäre aber auch möglich, dass es sich um ein Virus handelt, das aus dem Ursprungsgebiet dieser Landschildkröten-Art stammt und somit durch Einfuhr erkrankter Tiere importiert und weiter verbreitet wird. Nach den heutigen Erkenntnissen wird diese Spezies aufgrund morphologischer Kriterien als eigenständige Gattung innerhalb der Familie Testudinidae eingestuft (PERÄLÄ, 2002a/b). Das Verbreitungsgebiet liegt im Nördlichen Zentralasien (VETTER, 2002), wobei andere Landschildkröten-Arten in diesem Gebiet nicht vorkommen. Phylogenetische Untersuchungen bei Säugetieren haben ergeben, dass Abstammungslinien von verschiedenen Herpesviren mit denen ihrer natürlichen Wirte übereinstimmen (MC GEOCH und DAVISON, 1999). Somit wären durchaus Voraussetzungen gegeben, welche zu einer Adaptation einer Virus-Subspezies an diese phylogenetisch und räumlich abgegrenzte Gattung *Agr. horsfieldii* geführt haben könnten.

Die Ergebnisse anderer in der Literatur beschriebener Untersuchungen zeigen allerdings, dass nicht alle Herpesviren, die aus der Spezies *Agr. horsfieldii* isoliert wurden, dieser Restriktionsgruppe bzw. diesem Serotyp angehören. So untersuchten MARSCHANG et al. (2001a) noch vier weitere Isolate aus *Agr. horsfieldii* durch Restriktionsendonukleasen-Analyse und fanden hier keine Ähnlichkeit zu dem Isolat 1301/B99R/97, das in dieser Arbeit in Restriktionsgruppe III eingeordnet wurde. Auch im Neutralisationstest wurden drei weitere Isolate dieser Spezies als Antigen eingesetzt und konnten von den Seren anderer Spezies größtenteils neutralisiert werden. Im Rahmen dieser Untersuchungen testeten MARSCHANG (2000) und MARSCHANG et al. (2001a) auch das Isolat 1432/94, das hier ebenfalls eingesetzt wurde, wobei deren Ergebnisse mit denen dieser Arbeit und der Dissertation von BIERMANN (1995) insofern differieren, dass weder serologisch, noch im Restriktionsendonukleasen-Muster Ähnlichkeiten zu dem Isolat

1301/B99R/97 gefunden wurden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von BIERMANN (1995), wurde das Isolat 1432/94 in meiner Arbeit dem gleichen Serotyp und der gleichen Restriktionsgruppe wie das Isolat 1301/B99R/97 zugeordnet. FROST und SCHMIDT (1997) gelang es ebenfalls, bei 8 von 44 Seren der Spezies *Agr. horsfieldii* Antikörper gegen das Antigen einer *T. hermanni* nachzuweisen. Daher ist nicht in jedem Fall davon auszugehen, dass jede *Agr. horsfieldii* ausschließlich an einer Herpesvirose des Serotyps 1432/94 erkrankt und nur Antikörper gegen Antigene dieses Virus bildet. Auf jeden Fall erscheint es aber sinnvoll, bei einem Neutralisationstest sowohl Antigen des Serotyps 1432/94 als auch Antigen des Serotyps V770/95 einzusetzen, da sonst offensichtlich die Gefahr falsch negativer Ergebnisse besteht.

5.3 Auslösende Faktoren einer Herpesvirus-Erkrankung und Einfluss der Spezies auf eine Erkrankung und auf den Krankheitsverlauf

Um zu überprüfen, ob die Virusisolate auch klinisch voneinander unterscheidbare Symptome ausbilden, wurde soweit möglich bei der Auswertung der Vorberichte und der Krankheitsverläufe der Frage nachgegangen, welche Landschildkröten-Spezies im Bestand vorhanden waren, welche Spezies erkrankten, welche die Infektion eventuell überlebten, zu welcher Jahreszeit die Ausbrüche stattfanden und wo die mögliche Infektionsquelle lag. Leider waren die Informationen nicht immer lückenlos zu bekommen.

Die 35 Tiere, aus denen die Isolate stammten, gehörten der Spezies *T. hermanni* (14 Tiere), *T. graeca* (6 Tiere), *Agr. horsfieldii* (10 Tiere), *G. pardalis* (3 Tiere), *G. carbonaria* (1 Tier) und *M. emys emys* (1 Tier) an.

Alle Tiere mit einer Ausnahme (4295/7R/95) zeigten typische Krankheitsanzeichen, wie respiratorische Symptome und Stomatitis oder waren plötzlich verstorben. Isolat 4295/7R/95 stammte aus einer symptomlosen *T. hermanni*, die in einem Bestand mit klinisch erkrankten Tieren lebte.

Die in der Literatur beschriebenen Krankheitsverläufe in Bezug auf Speziesverteilung und Mortalitätsrate unterschieden sich teilweise, insbesondere wenn in den Beständen mehrere Arten zusammen gehalten wurden. So wurde immer wieder eine speziesabhängig unterschiedliche Empfänglichkeit für das Virus beschrieben.

JACOBSON et al., (1985) berichteten von einem aus *G. chilensis* und *G. carbonaria* bestehenden Bestand, in dem nur die *G. chilensis* erkrankten.

KABISCH und FROST (1994), MARSCHANG et al. (1997a), MARSCHANG (2000), BLAHAK in MCARTHUR et al. (2002) beobachteten in einigen Fällen eine Resistenz gegen die Erkrankung bei *T. graeca*. KABISCH und FROST (1994), MARSCHANG et al. (1997a), SCHMIDT (2000) und MATHES (2004) führten diese Resistenz auf die Fähigkeit dieser Spezies zurück, hohe Antikörper-Titer gegen das Virus bilden zu können.

Geht man davon aus, dass in Deutschland die Spezies *T. graeca*, *T. hermanni* und *Agr. horsfieldii* zu den am häufigsten gehaltenen Arten gehören, fällt auf, dass in dieser Arbeit nur aus vergleichsweise wenigen Tieren der Spezies *T. graeca* ein Herpesvirus isoliert werden konnte. Dies könnte ebenfalls ein Hinweis auf eine geringere Anfälligkeit für eine Herpesvirose oder eine geringere Mortalität dieser Landschildkrötenart sein.

Trotzdem stehen diesen Beobachtungen eine Reihe von Veröffentlichungen entgegen, in denen auch von *T. graeca* berichtet wurde, die an einer Herpesvirusinfektion erkrankten bzw. verstarben (COOPER et al., 1988; MÜLLER et al., 1990; MURO et al., 1998; DRURY et al., 1999a; MARSCHANG, 2000).

MARSCHANG (2000) vermutete Herpesvirus-Stämme mit unterschiedlicher Virulenz, nachdem sie in einem Bestand („Bestand F“) eine geringere Mortalitätsrate unter den infizierten Schildkröten feststellte, als in anderen Beständen.

SCHMIDT (2000) fand bei Serumneutralisationstests nur eine geringe Anzahl seropositiver Tiere der Spezies *Agr. horsfieldii* und *T. hermanni* und vermutete eine schlechte Immunitätslage oder eine mangelhafte Adaptation des Virus an diese Spezies als Grund für die bestehende hohe Mortalität.

MARSCHANG et al. (2001b) stellten bei Titerbestimmungen nach Vakzination mit Herpesvirus fest, dass mit einer Ausnahme nur Tiere der Spezies *T. graeca* und *T. marginata* messbare Antikörper gegen das Virus entwickelten. Tiere der Spezies *T. hermanni* bildeten keine Antikörper. Diese fehlende Immunantwort sahen die Autoren als mögliche Erklärung für die bei KABISCH und FROST (1994) und MARSCHANG et al. (1997a) beschriebene hohe Sterblichkeit dieser Spezies bei Herpesvirus-Infektionen an.

Bei den eigenen untersuchten Isolaten aus Beständen mit mehreren Spezies zeigte sich in Bezug auf die erkrankten Arten, aus denen die Isolate stammten, eine Reihe von Variationen.

In dem Bestand, aus dem das Virusisolat V7127/98 stammte, erkrankten nur *T. hermanni* – keine der ebenfalls mit diesen zusammenlebenden *T. graeca* zeigte Symptome.

Die gleiche Verteilung in Bezug auf die erkrankten Spezies zeigte sich im Bestand von V1114/99, V1568/99 und V1572/99.

Das entgegengesetzte Bild zeigt sich in dem Bestand von V120/99: Hier erkrankten nur die beiden *T. graeca* und die *T. hermanni* zeigte keinerlei Symptome.

In dem Bestand von V1576/99 und V1577/99 erkrankten dagegen Tiere beider Spezies.

In dem Bestand von V3950/99, in dem *Agr. horsfieldii* und *T. hermanni* lebten, infizierten sich beide Spezies – überlebende Tiere waren nur *Agr. horsfieldii*.

Nachdem bei Krankheitsausbrüchen vorberichtlich oft klinisch gesund erscheinende Tiere in den Bestand gesetzt worden waren, die nach unterschiedlich langen Zeiträumen erkrankten, wurde immer wieder die Möglichkeit diskutiert, dass latent infizierte Tiere das Virus symptomlos in sich tragen und erst nach unterschiedlichen Stress-Situationen erneut oder erstmalig zu Virusausscheidern werden (MÜLLER et al., 1990; MURO et al., 1998; UNE et al., 1999; BLAHAK, 2000; MARSCHANG, 2000). Auch hier werden als Trägertiere immer wieder *T. graeca*, *T. marginata* und *T. carbonaria* genannt (SCHMIDT, 2000; TEIFKE et al., 2000, MCARTHUR et al., 2002). TEIFKE et al. (2000) untersuchten Neuronen und Gliazellen des Groß- und Kleinhirns, sowie Ganglien des Plexus myentericus und wiesen dort Herpesvirus-DNA nach. Fehlende entzündliche Reaktion der Zellen auf das Virus und die Tatsache, dass Neuronen als Latenzort bei vielen Herpesviren nachgewiesen wurden, ließen sie hier den Ort der Latenz der Landschildkröten-Herpesviren vermuten.

In den eigenen Untersuchungen fanden sich drei Bestände (Bestand von V7127/98, V120/99 und 4295/7R/95), in die das Virus wahrscheinlich durch eine klinisch unauffällige *T. graeca* hineingetragen wurde. In dem Bestand von 2245/92 war das Überträgertier eine symptomlose *T. hermanni*.

In drei Beständen (V7127/98, V120/99 und V1114/99, V1568/99, V1572/99) trat die Erkrankung nach der Winterruhe auf und in drei weiteren Beständen (V7392/98, 4295/7R/95 und 2245/92) erst Monate später, nachdem das symptomlose Trägartier in den Bestand eingesetzt worden war.

Generell zeigen sich also in Bezug auf Speziesverteilung und Krankheitsverlauf eine Fülle von Möglichkeiten und Variationen und es lässt sich demnach nur eine tendenzielle Aussage über die Empfänglichkeit bestimmter Spezies gegenüber dem Virus machen. Allein die Zugehörigkeit zu einer Landschildkrötenart schützt nicht vor einer Erkrankung und jede symptomlose Schildkröte kommt trotzdem als potentieller Virusausscheider in Frage. Hier scheinen weitere Faktoren, wie z.B. die Virulenz des einzelnen Erregers oder eventuell das Vorhandensein verschiedener Virustypen oder Subtypen eine Rolle zu spielen. Die Annahme, dass das Virus in ein Stadium der Latenz gehen kann und durch verschiedene Stressfaktoren, z.B. Resistenzminderung nach der Winterruhe, reaktiviert werden kann, wurde durch die in einigen Beständen nachvollziehbare Einschleppung des Erregers bestätigt.

Die Organe, aus denen das Virus isoliert werden konnte, sind bluthaltig, so dass daraus geschlossen werden kann, dass ein Virämie-Stadium stattfindet. Das bestätigt auch die Isolierung von Herpesviren aus peripheren Leukozyten durch MARSCHANG (2000). Da auch Tiere ohne vorherige Krankheitsanzeichen plötzlich versterben, bleibt die Genese der eigentlichen Erkrankungs- und Todesursache letztlich vorerst ungeklärt.

5.4 Nachweis von Landschildkröten-Herpesvirus-DNA mittels PCR

Es existieren eine Reihe von direkten und indirekten Verfahren zum Nachweis des Herpesvirus bei Landschildkröten. Dazu gehören die Sichtbarmachung des Virus durch Elektronenmikroskopie (HARPER et al., 1982; COOPER et al., 1988; BRAUNE et al., 1989; MARSCHANG et al., 1997a; MURO et al., 1998), der histologische Nachweis von viralen Kern-Einschlußkörperchen (JACOBSON et al., 1985; LANGE et al., 1989; PETTAN-BREWER et al., 1996; KABISCH und FROST, 1994; TEIFKE et al., 2000), die Vermehrung von Virus in Zellkultur mit Ausbildung eines typischen cpE (BIERMANN und BLAHAK, 1993; KABISCH und

FROST, 1994; MARSCHANG et al., 1997a; MARSCHANG, 2000), der Nachweis von Antikörpern im Serumneutralisationstest (KABISCH und FROST, 1994; FROST und SCHMIDT, 1997, MARSCHANG et al., 1997a; SCHMIDT, 2000; MATHES, 2004) oder mittels ELISA (ORIGGI et al., 2001) oder der Nachweis von Virusantigenen bzw. Virusantikörpern mit Hilfe der Immunoperoxidase-Technik (ORIGGI et al., 2003).

Daneben fanden sich in der Literatur ebenfalls molekularbiologische Verfahren zur Diagnose einer Herpesvirus-Infektion. TEIFKE et al. (2000) beschrieben den Nachweis von Herpesvirus-DNA im Gewebe von erkrankten Landschildkröten durch *In-situ* Hybridisierung. UNE et al. (1999) nutzten eine bei VAN DEVANTER et al. (1996) für den Nachweis von diversen Herpesviren beschriebene PCR mit degenerierten Consensus Primern im Multiplex Format. MURAKAMI et al. (2001) verwendeten eine heminested PCR zum Nachweis der herpesviralen DNA.

Um festzustellen, ob der sichere, routinemäßige Nachweis einer Herpesvirose bei Landschildkröten durch die in der Literatur beschriebenen PCR-Methoden möglich ist, wurden Sensitivität und Spezifität der dort beschriebenen Primer an den gewonnenen Herpesvirus-Isolaten, Organ- und Rachentupferproben, weiteren Herpesviren und Mikroorganismen, die nicht zu der Familie der Herpesviren gehören, überprüft.

Mit den Primern nach VAN DEVANTER et al. (1996) (PCR3) und TEIFKE et al. (2000) (PCR1) konnten alle getesteten Landschildkröten-Herpesvirusisolate aus infiziertem Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Bei der Bestimmung der optimalen Annealing-Temperatur ergaben sich bei der PCR1 nach TEIFKE et al. (2000) im Gegensatz zu der PCR nach VAN DEVANTER et al. (1996) allerdings Unterschiede unter den Isolaten. So fand zwischen der untersuchten Temperatur von 43-60 °C bei den Isolaten der Restriktionsgruppe III ein Primer-Annealing nur bis zu einer Maximaltemperatur zwischen 48,3 und 54,3 °C statt, während bei den übrigen Herpesvirus-Isolaten auch bei den höheren Temperaturen positive Ergebnisse erzielt wurden (siehe Tab. 19). Da eine niedrige Annealing-Temperatur unspezifische Bindungen der Primer begünstigt, könnte dies ein Hinweis dafür sein,

dass die Primer-Sequenz nicht vollständig homolog zu der entsprechenden Zielsequenz der Virus-DNA dieser Isolate ist.

Bei der PCR2 mit den Primern nach MURAKAMI et al. (2001) konnten nur die Isolate der Restriktionsgruppe III nachgewiesen werden, was ebenfalls ein Hinweis dafür sein könnte, dass auch bei diesem Gen-Locus eine abweichende DNA-Sequenz das Primer-Annealing verhindert. Unter den nachweisbaren Isolaten gab es keine Unterschiede in der optimalen Annealing-Temperatur.

Diese selektive Primer-Spezifität könnte somit zusätzlich mit den Ergebnissen der Restriktionsanalyse und der Neutralisationstests die Annahme unterstützen, dass unter den Landschildkröten-Herpesviren zwei verschiedene Subspezies mit den Isolaten der Restriktionsgruppe I und II (aus diversen Spezies isoliert) auf der einen Seite und den Isolaten der Restriktionsgruppe III (ausschließlich aus der Spezies *Agr. horsfieldii* isoliert) auf der anderen Seite existieren. Bei Betrachtung der Primer-Herkunft ergibt sich zusätzlich ein Hinweis auf diese unterschiedliche Speziesverteilung der Subspezies, da die Primer-Sequenzen nach TEIFKE et al. (2000) von einem DNA-Abschnitt eines Isolates aus einer *T. hermanni* stammten (Isolat 4295/7R/95, das in dieser Arbeit in Restriktionsgruppe I eingeordnet wurde), während die Primer-Sequenzen nach MURAKAMI et al. (2001) von dem DNA-Abschnitt eines Virusisolates einer *Agr. horsfieldii* synthetisiert wurden und in dieser Arbeit ein positives PCR Ergebnis ebenfalls nur bei den Isolaten dieser Landschildkrötenart erzielt wurde.

Neben der Amplifikation von herpesviraler DNA aus Virusproben, die auf Zellkultur gewachsen waren, wurde ebenfalls versucht, in den Organ- und Rachentupferproben der Tiere, aus denen die Isolate gewonnen wurden, Herpesvirus-DNA nachzuweisen.

Nur mit den Primern nach VAN DEVANTER et al. (1996) konnte bei allen Tieren, von denen Gewebe- oder Tupferproben vorhanden waren, in der Secondary PCR Virus-DNA nachgewiesen werden. Die Anzahl von positiven PCR-Ergebnissen mit den Primern nach TEIFKE et al. (2000) war deutlich geringer und mit den Primern nach MURAKAMI et al. (2001) konnte wiederum nur Virus-DNA aus Gewebe- und

Tupferproben nachgewiesen werden, die von Virusisolaten der Restriktionsgruppe III stammten (siehe Tab. 20-23).

Aufgrund dieses Ergebnisses lässt sich schließen, dass zum routinemäßigen klinischen Nachweis einer Herpesvirose bei Landschildkröten nur die Primer nach VAN DEVANTER et al. (1996) geeignet sind, da die Wahrscheinlichkeit falsch negativer Ergebnisse bei einer PCR mit Primern nach TEIFKE et al. (2000) und MURAKAMI et al. (2001) zu hoch ist. Die besseren Ergebnisse der PCR nach VAN DEVANTER et al. (1996) könnten dadurch zustande kommen, dass durch die Consensus-Primer ein Primer-Annealing bei Virusisolaten mit untereinander abweichender DNA-Sequenz trotzdem mit gleicher Sensitivität stattfinden kann. Zusätzlich könnte auch das nested Format der PCR nach VAN DEVANTER et al. (1996) zu einer im Vergleich zu der PCR nach TEIFKE et al. (2000) höheren Sensitivität geführt haben, da sich bei diesem Verfahren die Ausbeute des PCR-Produktes erhöht (NEWTON und GRAHAM, 1994). So kann auch die in den Organ- und Tupferproben möglicherweise in geringeren Mengen vorhandene Virus-DNA amplifiziert werden. Allerdings zeigen die Resultate der Spezifitätsprüfung, dass mit einer PCR nach VAN DEVANTER et al. (1996) aufgrund der verwendeten Consensusprimer falsch positive Ergebnisse möglich sind, da auch die DNA anderer Herpesviren amplifiziert wird (siehe Abb. 82). Aufgrund der großen Zahl an existierenden Herpesviren ist es denkbar, dass auch bei Landschildkröten weitere Vertreter dieser Virusfamilie existieren, deren DNA dann in der PCR vervielfältigt würde.

Insgesamt wurde Herpesvirus-DNA im Gewebe von Zunge, Lunge, Trachea, Kehlkopf, Leber, Darm, Gehirn, Herz, Niere und in Rachentupferproben nachgewiesen. Dieses Ergebnis deckt sich mit den in der Literatur beschriebenen Untersuchungen, bei denen bisher durch verschiedene Verfahren Herpesvirus ebenfalls in einer Reihe von Organen nachgewiesen wurde (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; KÜBER-HEISS et al., 1999; MÜLLER et al., 1990; UNE et al., 1999; MARSCHANG, 2000; TEIFKE et al., 2000). Damit bestätigten die PCR-Ergebnisse den systemischen Charakter der Erkrankung (TEIFKE et al., 2000).

Schlussfolgerung

Die durchgeführten Untersuchungen zeigen Unterschiede innerhalb der Gruppe der Herpesviren bei Landschildkröten auf.

Die Unterschiede zeigen sich sowohl auf molekularbiologischer Ebene in einem divergierenden Spaltpattern nach Restriktionsendonukleasen-Analyse und unterschiedlicher Primer-Sensitivitäten bei Durchführung von verschiedenen PCR-Protokollen als auch serologisch.

Aufgrund ihres Restriktionsendonukleasen-Musters können die 35 Virusisolate in drei unterschiedliche Gruppen eingeteilt werden (Restriktionsgruppe I-III).

Serologisch existieren zwei Virustypen, welche die Bildung unterschiedlicher Antikörper induzieren. Zum Serotyp 770/95 gehören die Isolate der Restriktionsgruppen I und II und zu Serotyp 1432/94 die Isolate der Restriktionsgruppe III.

Das Virus der Restriktionsgruppe III wurde in dieser Arbeit ausschließlich aus Tieren der Spezies *Agr. horsfieldii* isoliert, ebenso wie ein Großteil der Seren, die Antikörper gegen den Serotyp 1432/94 besaßen, wobei die Gründe für diese Speziesverteilung noch nicht bekannt sind.

Zur Diagnose einer Herpesvirose kann eine PCR mit Consensus Primern nach VAN DEVANTER et al. (1996) eingesetzt werden. Die Primer nach TEIFKE et al. (2000) besitzen für den Nachweis von Virus-DNA aus Organ- und Rachentupferproben eine geringere Sensitivität und die Primer nach MURAKAMI et al. (2001) amplifizieren nur die DNA der Virusisolate der Restriktionsgruppe III.

Am lebenden Tier eignet sich als Probenmaterial zum Einsatz in die PCR ein Rachentupfer und als Gewebeprobe sollten Zungen-, Kehlkopf- und Tracheagewebe eingesetzt werden, da hier der DNA-Nachweis am sichersten gelingt.

Über das Pathogenitätsverhalten lässt sich bisher noch keine generelle Aussage treffen. Grundsätzlich ist jede Spezies als empfänglich für beide Serotypen anzusehen und kann symptomloser Träger des Erregers sein. Soll ein neues Tier mit unbekanntem Infektionsstatus in eine Tiergruppe integriert werden, sollte es zuvor wiederholt serologisch, und zwar auf Antikörper gegen beide Serotypen untersucht werden, da sonst falsch negative Ergebnisse zu erwarten sind.

Ausblick

Nachdem innerhalb der Herpesviren bei Landschildkröten molekularbiologisch und serologisch erste Unterschiede festgestellt wurden, sind weiterhin noch viele Fragen offen. So ist noch weitgehend unbekannt, wie sich die Unterschiede im klinischen Verhalten, beispielsweise in unterschiedlicher Virulenz, auswirken. Auch besteht weiterhin das Problem, klinisch unauffällige Virusträger oder Virusausscheider sicher zu erkennen. Hierfür wäre es wichtig, zunächst das Organ, in dem sich das latente Virus befindet, zu finden – beispielsweise durch Ko-Kultivierung des Virus aus entsprechendem Gewebe oder durch in situ-Hybridisierung.

Sequenzvergleiche von Genomteilabschnitten zeigten Übereinstimmungen zu der Sequenz anderer Alphaherpesviren (TEIFKE et al., 2000, MURAKAMI et al., 2001). Eine offizielle Einteilung der Landschildkröten-Herpesviren in eine der Subfamilien fand aber seitens des ICTV noch nicht statt. Hier wurden aus Schildkröten isolierte Herpesviren bisher den „nicht-benannten Mitgliedern der Herpesvirus-Familie“ („Unassigned Members of the Family“) zugeordnet (MINSON et al., 2000; MODROW et al., 2003).

Um diese Fragen zu klären, ist neben klinischen Untersuchungen die Untersuchung des Genoms durch weitere Sequenzierungen notwendig. Auch phylogenetische Aussagen, die Herkunft des Virus und verwandtschaftliche Beziehungen zu anderen Herpesviren betreffend, sollten durch Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenz möglich werden.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, durch Restriktionsendonukleasen-Analyse, Neutralisationstest und PCR-Verfahren, Herpesviren aus Landschildkröten auf molekularbiologische und serologische Unterschiede zu untersuchen.

Die durch Restriktionsendonukleasen untersuchten 35 Virusisolate stammten von 6 verschiedenen Landschildkröten-Spezies und wurden in den Jahren 1997-2003 aus unterschiedlichen Beständen isoliert. Bei den Schildkröten, aus denen die Viren isoliert wurden, handelte es sich um 14 Griechische Landschildkröten (*Testudo hermanni*), 6 Maurische Landschildkröten (*Testudo graeca*), 3 Pantherschildkröten (*Geochelone pardalis*), 10 Vierzehenschildkröten (*Agrionemys horsfieldii*), eine Köhlerschildkröte (*Geochelone (Testudo) carbonaria*) und eine Asiatische braune Landschildkröte (*Manouria emys emys*). Aufgrund ihrer Morphologie im Elektronenmikroskop, ihrer Chloroformempfindlichkeit und dem das Wachstum auf Zellkultur inhibierenden Effekt durch 5-Jodo-2'-Desoxyuridin (IUDR) wurden die Virusisolate der Familie der Herpesviren zugeordnet.

Die isolierte und aufgereinigte Virus-DNA wurde durch die Restriktionsendonukleasen BamH I, Hind III und Sal I gespalten und die Spaltmuster miteinander verglichen.

Daneben wurden 49 Serumproben von 5 Landschildkröten-Spezies, die an einer Herpesvirose erkrankt waren, auf Antikörper gegen Herpesviren untersucht. Die Seren stammten von 10 Griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*), 12 Maurischen Landschildkröten (*Testudo graeca*), 5 Breitrandschildkröten (*Testudo marginata*), 21 Vierzehenschildkröten (*Agrionemys horsfieldii*) und einer Waldschildkröte (*Testudo denticulata*). Zur Antigen-Herstellung wurden drei Isolate verwendet, die sich im Restriktionsendonukleasen-Muster deutlich unterschieden hatten.

Zusätzlich wurden aus der Literatur entnommene Primer (VAN DEVANTER et al., 1996; TEIFKE et al., 2000; MURAKAMI et al., 2001), die zum PCR-Nachweis von Herpesviren entwickelt wurden, an den auf Zellkulturen angezüchteten Isolaten und an Organ- und Rachentupferproben, die von einem Teil der Schildkröten, von

denen die Virus-Isolate stammten, auf ihre Sensitivität und Spezifität überprüft. Darüber hinaus wurde die Spezifität der Primer getestet, indem weitere Vertreter der Unterfamilie der Herpesviren, ein Reovirus, ein Paramyxovirus, ein Iridovirus, ein Mykoplasmen- und ein Chlamydien-Isolat in die PCR eingesetzt wurden.

Die Untersuchungen zeigen, dass der Erreger der Herpesvirose bei Landschildkröten je nach Untersuchungsmethode in zwei oder drei Gruppen eingeteilt werden kann. Nach dem Restriktionsendonukleasen-Muster konnten drei Gruppen unterschieden werden (Restriktionsgruppe I-III). Die Virus-Isolate der Restriktionsgruppen I und II stammen aus verschiedenen Landschildkröten-Spezies außer der Spezies *Agr. horsfieldii*, während alle Isolate der Restriktionsgruppe III aus dieser Landschildkröten-Art isoliert wurden.

Im Neutralisationstest wurden zwei Serotypen gefunden, die sich auch im Restriktions-Muster unterscheiden. Zu Serotyp 1 gehören die Isolate aus Restriktionsgruppe I und II. Zu Serotyp 2 gehören die Isolate aus der Restriktionsgruppe III. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von BIERMANN (1995) und MARSCHANG et al. (2001a) überein, die bei ihren Untersuchungen ebenfalls jeweils ein Isolat gefunden hatten, welches sich serologisch von den anderen Isolaten unterschied. Bei MARSCHANG et al. (2001a) unterschied sich das Isolat auch in seinem Restriktionsendonukleasen-Muster von den übrigen Isolaten.

Der Vergleich der drei PCR-Protokolle zeigte, dass die PCR nach MURAKAMI et al. (2001) nur die DNA der Virus-Isolate amplifizierte, die in Restriktionsgruppe III eingeordnet wurden. Die PCR-Protokolle nach TEIFKE et al. (2000) und VAN DEVANTER et al. (1996) erzielten bei allen Virusisolaten positive Ergebnisse, allerdings musste die Annealing-Temperatur der PCR nach TEIFKE et al. (2000) korrigiert werden. Bei dem Nachweis von Virus-DNA aus Organ- und Rachentupferproben von den Tieren, aus denen die Isolate stammten, wurden mit der PCR nach VAN DEVANTER et al. (1996) häufiger positive Ergebnisse erzielt, als mit der PCR nach TEIFKE et al. (2000). Allerdings weist die PCR nach VAN DEVANTER et al. (1996) auch die DNA anderer Herpesviren nach, da hier Consensusprimer mit einer allgemeinen Spezifität für die Familie der Herpesviren verwendet werden.

Diese Unterschiede auf molekularbiologischer und serologischer Ebene können für eine erfolgreiche Diagnostik von entscheidender Bedeutung sein. So müssen serologische Proben immer auf Antikörper gegen das Antigen von beiden Serotypen untersucht werden, um falsch negative Ergebnisse zu vermeiden.

Bei dem direkten Nachweis des Erregers durch PCR ist zu beachten, dass nicht alle in der Literatur beschriebenen Primer das Virus sicher nachweisen.

7 Summary

The purpose of this study was to analyse chelonid herpesviruses for differences by means of restriction endonuclease analysis, neutralisation test and PCR.

The 35 chelonid herpesvirus strains cleaved by restriction enzymes originated from six tortoise species and were isolated from different collections of land tortoises and from different outbreaks between 1997 and 2003. The tortoise species were 14 spur-tailed tortoises (*Testudo hermanni*), 6 Spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*), 3 Leopard tortoises (*Geochelone pardalis*), 10 Afghan tortoises (*Agrionemys horsfieldii*), a Red footed tortoise (*Geochelone (Testudo) carbonaria*) and an Asian land tortoise (*Manouria emys emys*). According to their sensitivity to chloroform, the inhibition of multiplication in cell-culture by IUDR and size and morphology of the particles, found by electron microscopy, the viruses were placed in the herpesvirus family.

The purified viral DNA was cleaved by the restriction enzymes BamH I, Hind III and Sal I, and the restriction pattern compared using an agarose gel electrophoresis.

Beyond that 49 known positive sera of 5 different species of tortoises were tested in a neutralisation test. The sera came from 10 Spur-tailed tortoises (*Testudo hermanni*), 12 Spur-thighed tortoises (*Testudo graeca*), 5 marginated tortoises (*Testudo marginata*), 21 Afghan tortoises (*Agrionemys horsfieldii*) and one yellow footed tortoise (*Testudo denticulata*). For this test, three strains which could be clearly distinguished in their restriction pattern were chosen as an antigene.

In addition three PCR protocols (TEIFKE et al., 2000; MURAKAMI et al., 2001; VAN DEVANTER et al., 1996) were used for amplification of DNA and compared concerning to their sensitivity. Tested were virus strains which had been grown on cell-cultures as well as tissue samples or pharyngeal swabs from a number of the animals. The specificity of the protocols was determined using herpesviruses from other species of the subfamily of alphaherpesvirinae as well as other reptilian pathogens: a Reovirus, a Paramyxovirus, an Iridovirus, a Mycoplasma- and a Chlamydia strain.

The results of the investigations revealed that chelonid herpesviruses can be differentiated into three or two groups, depending on the method used.

With restriction enzymes, the herpesviruses tested can be divided into three groups (restriction group I-III) according to their pattern.

The strains in restriction group I and II have been isolated from different species, but not from *A. horsfieldii*, whereas all isolates from restriction-group III originate from this species.

In the neutralisation test two serotypes were found which also can be distinguished according to their restriction pattern. This serological differentiation was possible between the restriction-group I and II isolates on one side and of the group III on the other side. These results conform to BIERMANN (1995) und MARSCHANG et al. (2001a), who also found one strain each, which differed from the others in the neutralisation test. The strain of MARSCHANG et al. (2001a) differed also in its restriction endonuclease pattern.

Comparison of the three PCR protocols showed that the PCR described by MURAKAMI et al. (2001) could only amplify DNA from viruses of the restriction endonuclease group III. The PCR methods of TEIFKE et al. (2000) and VAN DEVANTER et al. (1996) yielded positive results with all virus strains, but in the PCR protocol of TEIFKE et al. (2000), adapting of the annealing temperature was necessary. In detecting viral DNA in original tissue samples and pharyngeal swabs of the animals from which the 35 virus strains were isolated, the PCR of VAN DEVANTER et al. (1996) was more successful than the PCR of TEIFKE et al. (2000). As the consensus primers of the PCR of VAN DEVANTER et al. (1996) also detect DNA from other herpesviruses, false positive results are possible.

This study revealed serological and molecularbiological differences between tortoise herpesvirus strains, which can be of great significance in laboratory tests. Thus, it is important to use strains from both serotypes to test tortoises for antibodies against tortoise herpesvirus to avoid false negative results. In detecting virus DNA by PCR, it has to be taken into consideration, that not all primers used in this study are able to detect the virus with certainty.

8 Literatur

AGUIRRE, A.A., BALAZS, G.H., SPRAKER, T.R. und GROSS, T.S. (1995):
Adrenal and haematological responses to juvenile green turtles (*Chelonia mydas*)
with and without fibropapillomas.
Physiological Zoology 68, 831-854.

AINI, I., SHIH, L.M., CASTRO, A.E. und ZEE, Y.C. (1993):
Comparison of herpesvirus isolates from falcons, pigeons and psittacines by re-
striction endonuclease analysis.
Journal of Wildlife Diseases 29, 196-202.

ALLEN, G.R., YEARGEN, M.R. und BRYANS, J.T. (1983):
Alterations in the equine herpesvirus 1 genome after in vitro and in vivo passage.
Infection and Immunity 40, 436-439.

ANDREASEN, J.R., GLISSON, J.R. und VILLEGAS, P. (1990):
Differentiation of vaccine strains and Georgia field isolates of infectious laryngotra-
cheitis virus by restriction endonuclease fragment patterns.
Avian Diseases 34, 646-656.

ARBUR, W. und LINN, S. (1969):
DNA modification and restriction.
Annual Review Biochemistry 38, 467-500.

ARENS, M.Q. und SWIERKOSZ, E.M. (1983):
Simplified method for typing herpes simplex virus by restriction endonuclease
analysis.
Journal of Clinical Microbiology 17, 548-551.

BIERMANN, R. (1995):

Isolierung und Charakterisierung von Herpesviren bei Landschildkröten.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen.

BIERMANN, R. und BLAHAK, S. (1993):

First isolation of a herpesvirus from tortoises with diphtheroid-necrotizing stomatitis.

Abstracts 2nd World Congress of Herpetology, Adelaide, 29.12-06.01. S. 27.

BLAHAK, S. (1995):

Herpesvirus infection in land tortoises as a problem of chelonian conservation.

International Congress of Chelonian Conservation, Gonfaron, Frankreich, 6.7.-10.7.1995. S. 6.

BLAHAK, S. (2000):

Virusinfektionen bei Reptilien.

Praktischer Tierarzt 81, 92-112.

BRAUNE, S., GEISS, V. und THIEL, W. (1989):

Eine neue durch Herpesviren verursachte Erkrankung bei Landschildkröten.

Tierärztliche Praxis 17, 416-419.

BROOKS, D.E., GINN, P.E., MILLER, T.R., BRAMSON, L. und JACOBSON, E.R. (1994):

Ocular fibropapillomas of green turtles (*Chelonia mydas*)

Veterinary Pathology 31, 335-339.

BUBLOT, M., WELLEMANN, G., VAN BRESSEM, M.F., DUBUISSON, J., PASTORET, P.P. und THIRY, E. (1991):

Genomic diversity among bovine herpesvirus 4 field isolates.

Archives of Virology 116, 1-18.

CARTY, A.J., FRANKLIN, C.L., RILEY, L.K. und BESCH-WILLIFORD, C. (2001):
Diagnostic polymerase chain reaction assays for identification of murine polyo-
maviruses in biological samples.

Comparative Medicine 51, 145-149.

CHAMBERLAIN, J.S., GIBBS, R.A., RANIER, J.E., NGUYEN, P.N. und GASKEY,
C.T. (1988):

Deletion screening of the duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA
amplification.

Nucleic Acids Research 16, 11141-11156.

CHIEN, A., EDGAR, D.B. und TRELA, J.M. (1976):

Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquati-
cus*.

Journal of Bacteriology 127, 1550-1557.

CHRISTENSEN, L.S. (1988):

Comparison by restriction fragment pattern analysis and molecular characterisa-
tion of some European isolates of suid herpesvirus 1: A contribution to strain dif-
ferentiation of European isolates.

Archives of Virology 102, 39-47.

CHRISTENSEN, L.S., MADSEN, K.G., NYLIN, B. und RONSHOLT, L. (1996):

A contribution to the systematization of bovine herpesvirus 1 based on genomic
mapping by restriction fragment pattern analysis.

Virus Research 46, 177-182.

COBERLEY, S.S., HERBST, L.H., EHRHART, L.M., BAGLEY, D.A., HIRAMA, S.,
JACOBSON E.R. und KLEIN, P.A. (2001):

Survey of Florida green turtles for exposure to a disease-associated herpesvirus.

Diseases of Aquatic Organisms 47, 159-167.

COOPER, J.E., GSCHMEISSNER, S. und BONE, R.D. (1988):
Herpes-like virus particles in necrotic stomatitis of tortoises.
Veterinary Record 123, 554.

COX, W.R., RAPLEY, W.A. und BARKER, I.K. (1980):
Herpesvirus-like infection in a painted turtle (*Chrysemys picta*).
Journal of Wildlife Diseases 16, 445-449.

D'ARCE, R.C.F., ALMEIDA, R.S., SILVA, T.C., FRANCO, A.C., SPILCI, F.,
ROEHE, P.M. und ARNS, C.W. (2002):
Restriction endonuclease and mononuclear antibody analysis of Brazilian isolates
of bovine herpesviruses types 1 and 5.
Veterinary Microbiology 88, 315-324.

DAVISON, A.J. (2002):
Evolution of the herpesviruses.
Veterinary Microbiology 86, 69-88.

DE BIASI, R.L., KLEINSCHMIDT-DE MASTERS, B.K., WEINBERG, A. und TY-
LER, K.L. (2002):
Use of PCR for the diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous sys-
tem.
Journal of Clinical Virology 25, 5-11.

DE WIT, M.Y.L., FABER, W.R., KRIEG, S.R., DOUGLA, J.T., LUCAS, S.B.,
MONTREEWASUWAT, N., PATTYN, S.R.R., HUSSAIN, J.N., PONNIGHAUS,
J.M., HARTSKEERL, R.A. und KLASTAR, P.R. (1991):
Application of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium leprae* in
skin tissues.
Journal of Clinical Microbiology 29, 906-910.

DRURY, S.E.N., GOUGH, R.E., KAY, A.V. und MCARTHUR, S.D.J. (1999a):
Detection and isolation of a herpesvirus from a spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) in the UK.

Veterinary Record 145, 586-588.

DRURY, S.E., GOUGH, R.E. und MCARTHUR, S.D.J. (1999b):

Isolation and identification of herpesvirus and papillomavirus from tortoises in Great Britain.

Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Columbus, Ohio, USA, pp. 69-75.

FROST, J.W. und SCHMIDT, A. (1997):

Serological evidence for susceptibility of various tortoise species to herpesvirus infection.

Verhandlungsberichte über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, S. 25-28.

FRYE, F.L., OSHIRO, S., DUTRA, F.R. und CARNEY, J.D. (1977):

Herpesvirus-like infection in two Pacific pond turtles.

Journal of the American Medical Association 171, 882-884.

GABRISCH, K. und ZWART, P. (2001):

Schildkröten.

In: Gabrisch, K. und Zwart, P. (Hrsg.) Krankheiten der Heimtiere.

Schlütersche, Hannover S.663-750.

GRAIL, A. und HARBOUR, D.A. (1990):

Restriction endonuclease analysis of DNA from isolates of feline herpesvirus type 1.

Japanese Journal of Veterinary Science 52, 1007-1013.

GRAVENDYCK, M. (1996):

Isolierung und biologische Eigenschaften eines neuen Herpesvirus aus einem Dreifarbenglanzstar (*Lamprotornis superbus* Rüppel, 1845) sowie Versuche zur Differenzierung von Herpesviren aus Passiformes durch Restriktionsendonukleasen.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen.

GÜNTHER, B. (1995):

Versuche zur Differenzierung von Herpesvirusisolaten aus verschiedenen Vogelarten durch Restriktionsendonukleasen.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Gießen.

HÄFELI, W. und SCHILDGER, B.J. (1995):

Reptilien. In: Krankheiten der Zoo- und Wildtiere.

Herausgeber Göltenboth, R. und Klös, H.-G. Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin, S. 530-554.

HARNISH, D.G., BELLAND, L.M., SCHEID, E.E. und ROHAN, T.E. (1999):

Evaluation of human papillomavirus-consensus primers for HPV detection by the polymerase chain reaction.

Molecular and Cellular Probes 13, 9-21.

HARPER, P.A.W., HAMMOND, D.C., und HEUSCHELE, W.P. (1982):

A herpesvirus-like agent associated with a pharyngeal abscess in a desert tortoise.

Journal of Wildlife Diseases 18, 491-494.

HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1989):

Herpesviridae causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoises (*Testudo hermanni*).

Herpetopathologica I, 5-9.

HERBST, L.H. (1994):

Fibropapillomatosis of marine turtles.

Annual Review of Fish Diseases 4, 389-425.

HERBST, L.H., GREINER, E.C., ERHART, L.M., BAGLEY, D.A. und KLEIN, P.A. (1998):

Serological Association between spirochidiasis, herpesvirus infection and fibropapillomatosis in green turtles from Florida.

Journal of Wildlife Diseases 34, 496-507.

HERBST, L.H., JACOBSON, E.R., MORETTI, R., BRAUN, T., SUNDBERG, J.P. und KLEIN, P.A. (1995):

Experimental Transmission of green turtle fibropapillomatosis using cell-free tumor extracts.

Diseases of Aquatic Organisms 22, 1-12.

HERBST, L.H. und KLEIN, P.A. (1995):

Green turtle fibropapillomatosis: Challenges to assessing the role of environmental cofactors.

Environmental Health Perspectives Journals 103, 27-30.

HERVÀS J., SÁNCHEZ-CORDÓN, P.J., CHACÓN DE LARA, F., CARRASCO, L. und GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C. (2002):

Hepatitis associated with herpes viral infection in the tortoise (*Testudo horsfieldii*).

Journal of veterinary medicine B 49, 111-114.

HOLT, P.E. und COOPER, J.E. (1976):

Stomatitis in the Greek tortoise (*Testudo graeca*).

Veterinary Record 98, 156.

JACOBSON, E.R., BUERGELT, C., WILLIAMS, B. und HARRIS, R.K. (1991):
Herpesvirus in cutaneous fibropapillomas of the green turtle *Chelonia mydas*.
Diseases of Aquatic Organisms 12, 1-6.

JACOBSON, E.R., CLUBB, S., GASKIN, J.M. und GARDINER, C. (1985):
Herpesvirus-like infection in Argentine tortoises.
Journal of the American Veterinary Medical Association 187, 1227-1229.

JACOBSON, E.R., GASKIN, J.M., ROELKE, M., GREINER, E.C. und ALLEN, J.
(1986):
Conjunctivitis, tracheitis and pneumonia associated with herpesvirus infection in
green sea turtles.
Journal of the American Veterinary Medical Association 189, 1020-1023.

JACOBSON, E.R., GASKIN, J.M. und WAHLQUIST, H. (1982):
Herpesvirus-like infection in map turtles.
Journal of the American Veterinary Medical Association 181, 1322-1324.

JOHNSON, A.J., JACOBSON, E.R., ORIGGI, F.C. und BROWN, R. (2003):
Herpesvirus infection in a captive desert tortoise (*Gopherus agassizii*)
Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian
Veterinarians (ARAV), Minneapolis, USA, p. 37.

KABISCH, D. und FROST, J.W. (1994):
Isolation of herpesvirus from *Testudo hermanni* and *Agrionemys horsfieldii*.
Verhandlungsberichte Erkrankungen der Zootiere 36, 241-245.

KEELER, C.L., HAZEL, J.W., HASTINGS, J.E. and ROSENBERGER, J.K. (1993):
Restriction endonuclease analysis of Delmarva field isolates of infectious laryn-
gotracheitis virus.
Avian Diseases 37, 418-426.

KIRISAWA, R., OHMORI, H., IWAI, H. und KAWAKAMI, Y. (1993):

The genomic diversity among equine herpesvirus-1 strains isolated in Japan.

Archives of Virology 129, 11-22.

KLEESE, W.C. (1980):

Environmental effects upon herpesvirus infections in captive green sea turtles.

In: SSAR Contributions to Herpetology Number 1, Reproductive Biology and Diseases of Captive Reptiles.

Eds.: Murphy, J.B. und Collins, J.T.

Copyright 1980 by the Society for the study of Amphibians and Reptiles, pp. 203-210.

KOTIW, M., WILKS, C.R. und MAY, J.T. (1982):

Differentiation of infectious laryngotracheitis virus strains using restriction endonucleases.

Avian Diseases 26, 718-731.

KÜBER-HEISS, A., SCHILCHER, F. und MÖSTL, K. (1999):

Herpesvirusinfektionen bei Landschildkröten in Österreich.

Wiener Tierärztliche Monatsschrift 86, 78-82.

LACHMUND, A. und SACHSE, G. (1994):

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und ihre Anwendungsbereiche.

In: PCR.

Gassen, H.G., Sachse, G.E. und Schulte, A. (Hrsg.). Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 1-13.

LACKOVICH, J.K., BROWN, D.R., HOMER, B.L., GARBER R.L., MADER, D.R., MORETTI, R.H., PATTERSON, A.D., HERBST, L.H., OROS, J., JACOBSON, E.R., CURRY, S.S. und KLEIN, P.A. (1999):

Association of herpesvirus with fibropapillomatosis of the green turtle *Chelonia mydas* and the loggerhead turtle *Caretta caretta* in Florida.

Diseases of Aquatic Organisms 37, 89-97.

LANGE, H., HERBST, W., WIECHERT, J.M. und SCHLIESSER, T. (1989):

Elektronenmikroskopischer Nachweis von Herpesviren bei einem Massensterben von griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*) und Vierzehenschildkröten (*Agryonemys horsfieldii*).

Tierärztliche Praxis 17, 319-321.

LEIB, D.A., BRADBURY, J.M., GASKELL, R.M., HUGHES, C.S. und JONES, R.C. (1986):

Restriction endonuclease patterns of some European and American isolates of avian infectious laryngotracheitis virus.

Avian Diseases 30, 835-837.

LI, J.W., WANG, X.W., XUAN, C.Q., ZHENG, J.L., JIN, M., SONG, N., SHI, X.Q. und CHAO, F.H. (2002):

Detection of enterovirus and hepatitis A virus in water by consensus primer multiplex RT-PCR.

World Journal of Gastroenterology 8, 699-702.

LURIA, S.E. und HUMAN, M.L. (1952):

A nonhereditary, host-induced variation of bacterial viruses.

Journal of Bacteriology 64, 557-569.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. und SAMBROOK, J. (1984):

Molecular cloning. A laboratory manual

Cold Spring Harbour Laboratory Press, pp.98-103.

MARSCHANG, R.E. (1999):

Evidence for a new herpesvirus serotype associated with stomatitis in Afghan tortoises (*Testudo horsfieldii*).

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Columbus, Ohio, USA, pp. 77-79.

MARSCHANG, R.E. (2000):

Isolierung und Charakterisierung von Irido-, Herpes- und Reoviren aus Landschildkröten sowie Beschreibung eines nicht charakterisierten zytopathogenen Agens.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen.

MARSCHANG, R.E., GRAVENDYCK, M., und KALETA, E.F. (1997a):

Herpesviruses in tortoises: investigations into virus isolation and the treatment of viral stomatitis in *Testudo hermanni* and *Testudo graeca*.

Journal of Veterinary Medicine B 44, 385-394.

MARSCHANG, R.E., GRAVENDYCK, M. und KALETA, E.F. (1997b):

New investigations on herpesviruses in tortoises.

Verhandlungsberichte Erkrankungen der Zootiere 38, 29-34.

MARSCHANG, R.E., GRAVENDYCK, M. und KALETA, E.F. (2001a):

Comparison of 16 chelonid herpesviruses by virus neutralisationstest and restriction endonuclease digestion of viral DNA.

Journal of Veterinary Medicine B 48, 393-399.

MARSCHANG, R.E., MCARTHUR, S. und BÖHM, R. (2003):

Comparison of five different methods for the detection of herpesvirus in a group of *Testudo horsfieldii* in Great Britain.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Minneapolis, USA, pp.15-17.

MARSCHANG, R.E., MILDE, K. und BELLAVISTA, M. (2001b):

Virus isolation and vaccination of Mediterranean tortoises against a chelonid herpesvirus in a chronically infected population in Italy.

Deutsch Tierärztliche Wochenschrift 108, 376-379.

MARSCHANG, R.E. und SCHNEIDER, R.M. (2002):

Detection of antibodies against chelonid herpesviruses in wild-caught spur-thighed tortoises, *Testudo graeca*, in Turkey.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Reno, Nevada, USA, pp.95-97.

MARTINEZ-SILVESTRE, A., MAJO, N. und RAMIS, A. (1999):

Caso clinico: Herpesvirosis en tortuga de desiertoamericana (*Gopherus agassizii*).

Clinica Veterinaria de Pequeños Animales 19, 99-106.

MATHES, K.A.; JACOBSON, E.R.; BLAHAK, S.; BRAUN, D.R.; SCHUMACHER I.M. und FERTARD, B. (2001):

Mycoplasma and herpesvirus detection in European terrestrial tortoises in France and Marocco.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Orlando, Florida, USA, pp. 97-99

MATHES, K.A. (2004):

Untersuchungen zum Vorkommen von Mykoplasmen und Herpesviren bei freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen mediterranen Landschildkröten (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca graeca* und *Testudo graeca iberia*) in Frankreich und Marokko.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen.

MAYO, M.A., FAUQUET, C.M. und MANILOFF, J. (2003):

Taxonomic proposals on the web: new ICTV consultative procedures.

Archives of Virology 148, 609-611.

MAYR, A., BACHMANN, P.A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1977):

Virologische Arbeitsmethoden, Bd 1 und 2.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 457-534.

MCARTHUR, S., BLAHAK, S., KÖELLE, P, JACOBSON, E.R., MARSCHANG;
R.E. und ORIGGI, F. (2002):

Chelonian herpesviruses.

Journal of Herpetological Medicine and Surgery 12, 14-31.

MCGEOCH, D.J. und DAVISON, A.J. (1999):

The molecular evolutionary history of the herpesviruses.

In: Domingo, E., Webster, R. und Holland, J. (eds.) Origin and evolution of vi-
ruses. Academic Press, San Diego, USA, pp. 441-465.

MINSON, A.C., DAVISON, A., EBERLE, R., DESROSIERS, R.C., FLECKEN-
STEIN, B., MCGEOCH, D.J., PELLET, P.E., ROIZMAN, B. und STUDDERT,
D.M.J. (2000):

Family *Herpesviridae*. In: Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, DC.M., Bishop,
D.H.L., Carstens, M.K., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A.,
McGeoch, D.J., Pringle, C.R. und Wickner, R.B. (eds.) Virus Taxonomy. Seventh
Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press,
San Diego, USA, pp. 203-225.

MODROW, S., FALKE, D. und TRUYEN, U. (2003):

Molekulare Virologie (2. Auflage).

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, S. 540-583.

MÜLLER, M., SACHSSE, W. und ZANGGER, N. (1990):

Herpes-Epidemie bei der griechischen (*T. hermanni*) und der maurischen Land-
schildkröte (*T. graeca*) in der Schweiz.

Schweizer Archiv für Tierheilkunde 132, 199-203.

MURAKAMI, M., MATSUBA, C., UNE, Y., NOMURA, Y. und FUJITANI, H. (2001):
Development of species-specific PCR techniques for the detection of tortoise
herpesvirus.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 13, 513-516.

MURO, J., RAMIS, A., PASTOR, J., VELARDE, R., TARRES, J. und LAVIN, S.
(1998):

Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spur-thighed tor-
toises from Spain.

Journal of Wildlife Diseases 34, 487-495.

NEWTON, C.R. und GRAHAM, A. (1994):

PCR, 2. Auflage.

Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

NIE, Y.C. und LU, C.P. (1999):

Antibody against *Testudo* herpesvirus is not common in chinese soft-shelled tur-
tles.

Journal of Veterinary Medicine B 46, 731-734.

OETTLE, E.E., STEYTLER, Y.G.M. und WILLIAMS, M.C. (1990):

High mortality in a tortoise colony.

South African Journal of Wildlife Research 20, 21-25.

ORIGGI, F.C., JACOBSON, E.R., ROMERO, C.H. und KLEIN, P.A. (2001a):

Tortoise herpesvirus and stomatitis-rhinitis in tortoises.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian
Veterinarians (ARAV), Orlando, Florida, USA, pp. 101-102.

ORIGGI, F.C., KLEIN, P.A., MATHES, K., BLAHAK, S., MARSCHANG, R.E., TUCKER, S.J. und JACOBSON, E.R. (2001b):

Enzyme-linked immunosorbent assay for detecting herpesvirus exposure in Mediterranean tortoises.

Journal of Clinical Microbiology 39, 3156-3163.

ORIGGI, F.C., KLEIN, P.A., TUCKER, S.J. und JACOBSON, E.R. (2000):

Serological and molecular diagnostic techniques for chelonian herpesviruses.

5th International Congress of the European Society for Veterinary Virology, 113-114.

ORIGGI, F.C., KLEIN, P.A., TUCKER, S.J. und JACOBSON, E.R. (2003):

Application of immunoperoxidase-based techniques to detect herpesvirus infection in tortoises.

Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 15, 133-140.

ORIGGI, F.C. und RIGONI, D. (2003):

An outbreak of tortoise herpesvirus infection in a private collection of mediterranean tortoises in italy: history, diagnosis, treatment, and followup.

Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Reno, Nevada, USA, pp. 21-23.

ORIGGI, F.C., ROMERO, C.H., BLOOM, D.C., KLEIN, P.A., GASKIN, J.M., TUCKER, S.J. und JACOBSON, E.R. (2004):

Experimental transmission of a herpesvirus in greek tortoises (*Testudo graeca*).

Veterinary Pathology 41, 50-61.

ORIGGI, F.C., ROMERO, C.H., KLEIN, P.A., BERRY, K.H., JOHNSON, A. und JACOBSON, E.R. (2002):

Preliminary serological and molecular evidence of tortoise herpesvirus exposure and infection in desert tortoises (*Gopherus agassizii*) from the Mojave and Colorado deserts of California.

Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Reno, Nevada, USA, pp. 27-29.

PERÄLÄ, J. (2002a):

The genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae) – phylogenetic interferences.

Chelonii 3, 32-39.

PERÄLÄ, J. (2002b):

Biodiversity in relatively neglected taxa of *Testudo* L., 1758 s.l..

Chelonii 3, 40-53.

PETTAN-BREWER, K.C.B., DREW, M.E., RAMSEY, E., MOHR, F.C. und LOWENSTINE, L.J. (1996):

Herpesvirus-particles associated with oral and respiratory lesions in a California desert tortoise (*Gopherus agassizii*).

Journal of Wildlife Diseases 32, 521-526.

PIDONE, C.L., GALOSI, C.M., ECHEVERRIA, M.G., NOSETTO, E.O. und ETCHEVERRIGARAY; M.E. (1999):

Restriction endonuclease analysis of BHV-1 and BHV-5 strains isolated in Argentina.

Journal of Veterinary Medicine B 46, 453-456.

PRATELLI, A., GRECO, G., DALL'ARA, P., ENGELS, M., TEMPESTA, M. und BUONAVOGLIA, C. (2000):

Restriction endonuclease analysis of the genom of two Italian caprine herpesvirus 1 strains.

Archives of Virology 145, 845-851.

PRATELLI, A., TEMPESTA, M., DE PALMA, M.G., MARTELLA, V. und BUONAVOGLIA, C. (1999):

Restriction endonuclease analysis of feline herpesvirus 1 DNA isolated from wild felids.

Veterinary Record 144, 537-538.

QUACKENBUSH, S.L., WORK; T.M., BALAZS, G.H., CASEY, R.N., ROVNAK, J., CHAVES, A., DU TOIT, L., BAINES, J.D., PARRISH, C.R., BOWSER, P.R. und CASEY, J.W. (1998):

Three closely related herpesviruses are associated with fibropapillomatosis in marine turtles.

Virology 246, 392-399.

READ, S.J. und KURTZ, J.B. (1999):

Laboratory diagnosis of common viral infections of the central nervous system by using a single multiplex PCR screening assay.

Journal of Clinical Microbiology 37, 1352-1355.

REBELL, G., RYWLIN, A. und HAINES, H. (1975):

A herpesvirus-type agent associated with skin lesions of green sea turtles in aquaculture.

American Journal of Veterinary Research 36, 1221-1224.

RENO, W.L., MC DANIEL, D.O., TURNER, W.W. und WILLIAMS, M.D. (2001):

Polymerase chain reaction for the detection of bacteremia.

American Journal of Surgery 67, 508-512.

ROIZMAN, B. (1982):

The family herpesviridae: general description, taxonomy and classification.

In: Roizman, B (ed.) The herpesviruses. Vol 1, Plenum Press, New York and London.

ROIZMAN, B. und TOGNON, M. (1983):

Restriction endonuclease patterns of herpes simplex virus DNA: Application to diagnosis and molecular epidemiology.

Current Topics in Microbiology and Immunology 104, 274-286.

ROIZMAN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C. und STUDDERT, M.J. (1992):

The family herpesviridae: an update.

Virology Division News, Archives of Virology 123, 425-449.

ROIZMAN, B., DESROSIERS, R.C., FLECKENSTEIN, B., LOPEZ, C., MINSON, A.C. und STUDDERT, M.J. (1995):

Herpesviridae.

In: Murphy, F.Y., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A. and Summers, M.D. (eds.) Virus Taxonomy. Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Springer-Verlag, New York, pp. 114-127.

ROLLE, M. und MAYR, A. (2002):

Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre für Tierärzte, Biologen und Agrarwissenschaftler, 7. Auflage.

Ferdinand Enke Verlag Stuttgart, S. 253-286.

RUPASINGHE, V., TAJIMA, T., MAEDA, K., IWATSUKI-HORIMOTO, K., SUGII, S. und HORIMOTO, T. (1999):

Analysis of porcine cytomegalovirus DNA polymerase by consensus primer PCR.

The Journal of Veterinary Science 61, 1253-1255.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B. und ERLICH, H.A. (1988):

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.

Science 238, 487-491.

SAIKI, R.K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K.B., HORN, G.T., ERLICH, H.A. und ARNHEIM, N. (1985):

Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

Science 230, 1350-1354.

SCHMIDT, A. (2000):

Herpesvirusinfektionen der Reptilien: Literaturübersicht und Untersuchung zum Vorkommen in Deutschland.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen.

SCHULTE, A. und SACHSE, G. (1994):

Weiterentwicklungen der PCR.

In: Gassen, H.G., Sachse, G.E. und Schulte, A. (Hrsg.) PCR. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, S. 112.

SCHUMACHER, J. (1996):

Viral diseases.

In: Mader, D.R. (ed.) Reptile Medicine and Surgery.

W.B.Saunders Co., Philadelphia, S. 226.

SMITH, H.O. und NATHANS, D. (1973):

A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes.

Journal of Molecular Biology 81, 419-423.

SMITH, H.O. und WILCOX; K.W. (1970):

A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*.

Journal of Molecular Biology 51 379-391.

SYKES, J.E., ALLEN, J.L., STUDDERT, V.P. und BROWNING, G.F. (2001):

Detection of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and *Chlamydia pcittaci* mucosal swabs by multiplex RT-PCR/PCR.

Veterinary Microbiology 81, 95-108.

TEIFKE, J.P., LÖHR, C.V., MARSCHANG, R.E., OSTERRIEDER, N. und POST-HAUS, H. (2000):

Detection of chelonid herpesvirus DNA by nonradioactive *in situ* hybridization in tissues from tortoises suffering from stomatitis-rhinitis complex in Europe and North America.

Veterinary Pathology 37, 377-385.

TISDALL, D.J., BENTLEY, C.B., COLLINS, D.M. und HORNER, G.W. (1984):

New Zealand caprine herpesvirus: comparison with an Australian isolate and with bovine herpesvirus type 1 by restriction endonuclease analysis.

New Zealand Veterinary Journal 32, 99-100.

UNE, Y., UEMURA, K., NAKANO, Y., KAMIIE, J., ISHIBASHI, T. und NOMURA, Y. (1999):

Herpesvirus infection in tortoises (*Malacochersus tornieri* and *Testudo horsfieldii*).

Veterinary Pathology 36, 624-627.

VAN DEVANTER, D.R., WARRENER, P., BENNETT, L., SCHULTZ, E.R., COULTER, S., GARBER, R.L. und ROSE, T.M. (1996):

Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR.

Journal of Clinical Microbiology 34, 1666-1671.

VARRASSO, A., DYNON, K., FICORILLI, N., HARTLEY, C.A., STUDDERT, M.J. und DRUMMER, H.E. (2001):

Identification of feline calicivirus, feline herpesvirus 1 and 4 by polymerase chain reaction.

The Australian Veterinary Journal 79, 563-569.

VETTER, H. (2002):

Schildkröten der Welt Band 1.

Verlag ACS GmbH (AQUALOG), Frankfurt, S. 3-15.

VICTOR, T., TOIT, R.D. und VAN HELDEN, P.H. (1992):

Purification of sputum samples through sucrose improves detection of *Mycobacterium tuberculosis* by polymerase chain reaction.

Journal of Clinical Microbiology 30, 1514-1517.

WENKER, C.J., POSTHAUS, H., HÄFELI, W., BAUMGARTNER, R. und ISEN-BÜGEL, E. (1997):

Parese der Hintergliedmassen bei Schildkröten und Echsen – Ausgewählte Fälle und Versuch einer diagnostischen Annäherung.

Verhandlungsbericht über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere,

Zürich: S. 51-56.

WHELEN, A.C. und PERSING, D.H. (1996):

The role of nucleic acid amplification and detection in clinical microbiology laboratory.

Annual Review of Microbiology 50, 349-373.

WHITE, T.J., MADEJI, R. und PERSING, D.H. (1992):

The polymerase chain reaction. Clinical applications.

Advances in Clinical Chemistry 29, 161-196.

WILSON, I.G. (1997):

Inhibition and facilitation of nucleic amplification.

Applied and Environmental Microbiology 63, 3741-3751.

WINNACKER, E.L. (1990):

Gene und Clone. Eine Einführung in die Gentechnologie. Dritter veränderter Nachdruck, VCH Weinheim, S. 1-24.

WITTE, A. (1993):

Ein Beitrag zum Nachweis von Antikörpern gegen Herpes- und Paramyxoviren bei verschiedenen Landschildkrötenarten.

Vet. Med. Diss., Justus-Liebig-Universität Giessen.

XUAN, X., HORIMOTO, T., ONO, M., LIMCUMPAO, A., TOHYA, Y., AZETAKA, M., TAKAHASHIE, E. und MIKAMI, T. (1993):

Restriction endonuclease analysis of canine herpesvirus isolates in Japan.

The Japanese Journal of Veterinary Science 52, 1181-1188.

Danksagung

Herzlich danke ich Herrn Prof. E.F. Kaleta für die Überlassung des Themas und für seine Unterstützung und Anregungen bei der Korrektur der Arbeit.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. S. Blahak für die Betreuung der Arbeit und für ihre Hilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Bedanken möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Staatlichen Untersuchungsamtes Detmold für die Bereitstellung eines Laborplatzes und der Arbeitsmaterialien, sowie für die mit viel Zeit und Geduld verbundene Einarbeitung in die Methoden der molekularbiologischen Virologie.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. D. Prager und Herrn Dr. J. Kilwinski vom Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Arnsberg für die elektronenmikroskopische Untersuchung meiner Virusisolate und für die Durchführung von DNA-Sequenzierungen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Mann Dirk, der so manchen Kampf mit dem Computer ausgefochten hat, um mir Zeit und Nerven zu sparen. Weiterhin möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die durch ihre moralische Unterstützung maßgeblich zum Zustandekommen dieser Arbeit beigetragen hat.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5117-3



9 783835 1174 7

