



**SCREENING VON BLUTPROBEN VON WILDLEBENDEN
UND IN GEFANGENSCHAFT GEHALTENEN SCHLANGEN
AUF ANTIKÖRPER GEGEN REO-, ADENO- UND
PARAMYXOVIREN, AUF RETROVIRALE DNA, SOWIE AUF
ZYTOPATHOGENE VIREN UND INTRAZYTOPLASMATISCHE
EINSCHLÜSSE IN BLUTZELLEN**

RALF MICHAEL MICHLING

INAUGURAL-DISSERTATION

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



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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

1. Auflage 2009

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 2009

© 2009 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

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

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. E. F. Kaleta

und dem

Institut für Umwelt- und Tierhygiene sowie Tiermedizin mit Tierklinik
der Universität Hohenheim, Stuttgart

Betreuer: Prof. Dr. R. Böhm

**Screening von Blutproben von wildlebenden und in
Gefangenschaft gehaltenen Schlangen auf Antikörper
gegen Reo-, Adeno- und Paramyxoviren, auf
retrovirale DNA, sowie auf zytopathogene Viren und
intrazytoplasmatische Einschlüsse in Blutzellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Ralf Michael Michling

Tierarzt aus Augsburg

Gießen, 2009

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

Dekan:

Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter:

Prof. Dr. E. F. Kaleta

Prof. Dr. R. Böhm

Tag der Disputation:

30.04.2009

1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Boid Inclusion body disease (IBD)	2
2.1.1	Einschlusskörperchen-Erkrankung bei Schlangen (Serpentes)	3
2.1.2	Klinische Symptome	5
2.1.3	Pathologische und histologische Befunde	5
2.2	Reovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Reptilienarten	5
2.2.1	Reovirusinfektionen bei Echsen (Sauria)	5
2.2.2	Reovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)	6
2.3	Schlangenarten, aus denen Reoviren isoliert und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden	7
2.3.1	Boiden	7
2.4	Adenovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Reptilienarten	8
2.4.1	Adenovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)	8
2.4.2	Adenovirusinfektionen bei Echsen (Sauria) und Krokodilen (Crocodylia)	8
2.4.3	Klinische Symptome	10
2.4.4	Pathologische und histologische Befunde	11
2.5	Schlangenarten, aus denen Adenoviren isoliert und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden	11
2.5.1	Boiden	11
2.6	Retrovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Schlangenarten	12
2.6.1	Retrovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)	12
2.6.2	Klinische Symptome	13
2.7	Paramyxovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Reptilienarten	14
2.7.1	Paramyxovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)	14
2.7.2	Paramyxovirusinfektionen bei Echsen (Sauria)	14
2.7.3	Klinische Symptome	15
2.7.4	Pathologische und histologische Befunde	16
2.8	Das Reovirus	16
2.8.1	Klassifizierung	16
2.8.1.1	Orthoreovirus	17
2.8.2	Eigenschaften der Orthoreoviren	17
2.8.2.1	Morphologie	17
2.8.2.2	Nukleinsäure (Genom)	17
2.9	Das Adenovirus	17
2.9.1	Klassifizierung	17
2.9.1.1	Atadenovirus	18
2.9.2	Eigenschaften der Adenoviren	18
2.9.2.1	Morphologie	18
2.9.2.2	Nukleinsäure (Genom)	18
2.10	Das Retrovirus	18
2.10.1	Klassifizierung	18
2.10.2	Eigenschaften der Retroviren	19
2.10.2.1	Morphologie	19
2.10.2.2	Nukleinsäure (Genom)	19
2.10.3	Virusreplikation	20
2.11	Das Paramyxovirus	22
2.11.1	Klassifizierung	22
2.11.2	Eigenschaften der Paramyxoviren	22
2.11.2.1	Morphologie	22
2.11.2.2	Nukleinsäure (Genom)	22
2.12	Fragestellung der eigenen Untersuchungen	23

3	MATERIAL und METHODEN	24
3.1	Material	24
3.1.1	Verwendete Virusisolate	24
3.1.2	Verwendete Organ- und Blutplasmaproben	25
3.1.2.1	Blutproben (Blutausstrich)	25
3.1.2.2	Blutplasmaproben	25
3.1.2.3	Tupferproben (Rachen, Kloake)	25
3.1.2.4	Organproben (Leber, Niere, Pankreas, Darm)	25
3.1.2.5	Negative und positive Kontrollseren	26
3.1.3	Medien und Reagenzien	26
3.1.3.1	Verwendete Zellkulturen	26
3.1.3.2	Medien und Reagenzien für Zellkulturen	26
3.1.3.3	Medien und Reagenzien für den Hämagglutinationstest	27
3.1.3.4	Reagenzien für Antiserumherstellung und antigenetische Untersuchungen	28
3.1.3.5	Medien und Reagenzien für Probenmaterial	29
3.1.3.6	Reagenzien für die Färbung von Blutausstrichen	29
3.1.3.7	Medien und Reagenzien für die Gelelektrophorese	30
3.1.3.8	Medien und Reagenzien für den Westernblot	32
3.1.3.9	Medien und Reagenzien für die PCR	34
3.1.3.10	Medien und Reagenzien für die Flachbeet-Agarosegelelektrophorese	34
3.1.3.11	Medien und Reagenzien für den ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay)	35
3.1.4	Weitere Materialien	37
3.2	Methoden	39
3.2.1	Gewinnung der Proben	39
3.2.1.1	Blutproben	39
3.2.1.2	Tupfer	40
3.2.1.3	Aufbereitung der Tupferproben	41
3.2.2	Blutausstriche	41
3.2.2.1	Färbung der Blutausstriche	42
3.2.2.2	Untersuchung und Beurteilung der Blutausstriche	42
3.2.2.3	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Blutausstriche	43
3.2.3	Zellkulturen	43
3.2.3.1	Primäre Zellkulturen	43
3.2.3.2	Subkulturen (permanente Zelllinie VH2)	43
3.2.3.3	Technik der Zellkulturbeimpfung	44
3.2.3.4	Passagierung	44
3.2.3.5	Virusernte	45
3.2.4	Hämagglutinationstest	45
3.2.5	Virustitration	45
3.2.6	Virus-Neutralisations-(VN)-Test	46
3.2.6.1	Konzentrierung und Reinigung des Virus	46
3.2.6.2	Immunisierung von Kaninchen	46
3.2.6.3	Aufbereitung des Blutplasmas von Kaninchen	47
3.2.6.4	Aufreinigung der Antikörper	47
3.2.6.5	Durchführung des Neutralisationstests	49
3.2.7	ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)	49
3.2.7.1	Konzentrierung und Reinigung der Schlangen-Antikörper	49
3.2.7.2	Immunisierung von Kaninchen	51
3.2.7.3	Plasmaaufbereitung	51
3.2.7.4	Antikörperaufreinigung	51
3.2.7.5	Durchführung des ELISA	52
3.2.8	PCR (Polymerase Chain Reaction)	53
3.2.8.1	Isolation der DNS aus kernhaltigen Blutzellen	53
3.2.8.2	Durchführung der PCR	53
3.2.8.3	Durchführung der Agarosegelelektrophorese	54
4	Ergebnisse	55
4.1	Virologische Untersuchungen	55

4.1.1	Virusisolierungen aus Blutproben in VH2-Zellkulturen	55
4.2	Serologische Untersuchungen	55
4.2.1	Ergebnisse der Virusneutralisations- (VN) und HAH-Teste	55
4.2.1.1	Antikörpertiter in Blutplasma von Schlangen gegen verschiedene Reptilienviren	55
4.2.1.2	Antikörperbildung in Kaninchen	58
4.2.2	Ergebnisse des ELISA	59
4.3	Blutzelluntersuchungen	59
4.3.1	Nachweis von Einschlusskörperchen im Blutaussstrich	59
4.4	PCR	60
4.4.1	Nachweis von Retrovirussequenzen	60
5	Diskussion	62
5.1	Blutuntersuchung	62
5.2	Virologische Untersuchungen	64
5.2.1	Virusisolierungsversuche	64
5.3	Serologische Untersuchungen	65
5.3.1	VNT mit Reo-, Adeno- und PMV-Viren	65
5.3.2	ELISA	67
5.4	PCR	67
6	Zusammenfassung	69
7	Summary	71
8	Literaturverzeichnis	73
9	Anhang	83

Verzeichnis der Tabellen und Grafiken

Tabelle 1: Anfärbarkeit von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen.....	3
Tabelle 2: Nachweis von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen bei verschiedenen Schlangen.	4
Tabelle 3: Nachweis von Reoviren bei verschiedenen Reptilienspezies.	7
Tabelle 4: Isolation von Reoviren aus Abgottschlangen (<i>Boa constrictor</i>).	8
Tabelle 5: Nachweise von Adenoviren bei verschiedenen Reptilien.	10
Tabelle 6: Isolation von Adenoviren bei Abgottschlangen (<i>Boa constrictor</i>).	12
Tabelle 7: Nachweis von Retroviren bei verschiedenen Schlangenarten.	13
Tabelle 8: Nachweis von Paramyxoviren bei verschiedenen Schlangen.....	15
Tabelle 9: Anamnestische Angaben, Symptome und Ergebnisse der pathologisch-anatomischen Untersuchungen der Schlangen, aus denen die Virusisolate stammen.	24
Tabelle 10: Angaben zur Herkunft und Erstbeschreibung der Virusisolate.	25
Tabelle 11: Herkunft und Anzahl der verwendeten Blutplasma-, Tupper- und Organproben. .	26
Bild 1: Blutprobenentnahme	40
Tabelle 12: Impfplan der Kaninchen.	47
Tabelle 13: Impfplan der Kaninchen.	51
Tabelle 14: Nachweis von virusneutralisierenden Antikörpern gegen Adenovirusisolat 27/2000.....	56
Tabelle 15: Nachweis von hämagglutinationshemmenden Antikörpern in Blutplasma-proben gegen das oPMV 5688/1991.	57
Tabelle 16: Nachweis von neutralisierenden Antikörpern in Blutplasma-proben gegen das Reovirus 26/2000.....	58
Tabelle 17: Neutralisationstiter gegen Reovirus der drei Kaninchen.....	59
Bild 2: Ergebnisse der PCR (hier exemplarisch Gel „pcr18+19b“ vom) auf Vorhandensein von retroviraler DNS-Sequenz.	61
Tabelle 18: Ergebnisse der Schlangen, die in wenigstens einer Untersuchung positiv waren	83

Abkürzungen

β-hämolys.	β-hämolysierend
μl	Mikroliter
μl/ml	Mikroliter pro Milliliter
A	Adult
Ak-Titer	Antikörpertiter
AlOH	Aluminiumhydroxid
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
Bisacryl	N',N'-Methyldiacrylamid
BME	Basal Medium Eagle's mit Earleschen Salzen
BSA	Bovines Serum Albumin
Bp	Basenpaare
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
cpE	zytopathischer Effekt
CR	Costa Rica
D	Deutschland
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DPB	Dulbecco's Posphate Buffer
dsRNS	doppelsträngige Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM	elektronenmikroskopisch

et al.	et altera
FKS	Fetales Kälberserum
G	Gramm
GB	Großbritannien
G/l	Gramm pro Liter
G/ml	Gramm pro Milliliter
H	Stunde, Stunden
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEF	Hühnerembryofibroblasten
het.	heterolog
hom.	homolog
I	Italien
IBD	Inclusion Body Disease (Einschlusskörperchen Krankheit)
IF	Immunfluoreszenz
IF-Technik	Immunfluoreszenz-Technik
IgH2	Iguana-Herz-Zellen
IE	infektiöse Einheit
IUDR	5-Jod-2-Desoxy-Uridin
J	juvenil
kDa	Kilodalton
KID	kulturinfektöse Dosis
log	Logarithmus
M	Molar
mA	Milliampere
max	maximal
min	minimal

Min.	Minute, Minuten
mittelgr.	mittelgroß
ml	Milliliter
ml/l	Milliliter pro Liter
Mol.-Gew.	Molekulargewicht
mRNS	Messenger-Ribonukleinsäure
N	Anzahl
Ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PBS	Posphate Buffered Saline (Phosphatpuffer)
PEG	Polyethylenglykol
pers. Mitteilung	persönliche Mitteilung
p.i.	post infectionem
PK-Wert	Prozentualer Neutralisationskapazitäts-Wert
PMV-1	Paramyxovirus des Serotyps 1
POD	Peroxidase
PTHA	Phosphorwolfram-Hämatoxylin
resp.	Respiratorisch
RNase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
Sec.	Sekunde, Sekunden
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ss	single stranded

SPF	Spezifiziert Pathogen-frei
spp.	Spezies
T	Tag, Tage
TAE	Tris-Natriumacetat-EDTA
Tit.	Titer
Tris	Tris (hydroxymethyl)- amminomethan
TPB	Tryptose-Phosphat-Brühe
Ü	Überstand
U.S.	United States
U/mg	Units pro Milligramm
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
VH2	Vipern-Herz-Zellen
VN	Virusneutralisation
VNT	Virusneutralisations-Test
Vol	Volumen
ZK	Zellkultur
ZNS	Zentralnervensystem
µl	Mikroliter

1 Einleitung

Reptilien werden als Haustiere immer populärer und werden inzwischen in vielen Haushalten in Deutschland gehalten. Durch diese Popularität werden Reptilienpatienten in der tierärztlichen Praxis immer häufiger gesehen. Riesenschlangen sind sowohl in privater Hand als auch in Zoos häufig anzutreffen. Viele Arten der Familie Boidae sind artenschutzrechtlich geschützt und im Anhang B der europäischen Artenschutzverordnung gelistet.

Infektionskrankheiten sind bei Reptilien in Gefangenschaft eine häufige Ursache für Verluste. Gerade der rege Handel und Tausch unter den Tierhaltern stellt eine große Gefahr dar, auch stellt der Import von Wildfängen ein zusätzliches Risiko dar. Erkrankungen mit langen Inkubationszeiten können unter solchen Bedingungen leicht verbreitet werden. Eine allgemein als ausreichend erachtete Quarantänezeit kann bei solchen Erkrankungen nicht ausreichend sein. Aufgrund der langen, mehrmonatigen Inkubationszeiten kann der Tierhalter nicht mehr nachvollziehen, mit welchem Tier die Erkrankung in den Bestand gelangte, und die Übertragungswege bleiben ungeklärt.

Besonders virale Infektionserkrankungen haben sehr an Bedeutung gewonnen. Viele Erkrankungen werden in diesem Zusammenhang beobachtet. In den letzten Jahren waren in der tierärztlichen Praxis zwei Themen von besonderer Bedeutung, die Paramyxoviren (AHNE et al., 1999) und die Retroviren im Zusammenhang mit der Einschlusskörperchen-Krankheit (IBD) (JACOBSON et al., 1999; MARSCHANG et al., 2001).

Bisherige Empfehlungen für die Diagnose der IBD bei lebenden Tieren verlangen Biopsien von Leber, Niere oder ösophagealen Tonsillen (JACOBSON et al., 1999). In Deutschland werden solche vorsorglichen Untersuchungen aufgrund des risikobehafteten Eingriffs, der dafür notwendig ist, äußerst selten unternommen. Die meisten Besitzer stimmen zudem einer solchen Untersuchung nicht zu. Häufig werden daher Blutausstriche zum Erregernachweis in den Blutzellen herangezogen. Diese Methode ist jedoch nicht geeignet, um eine Infektion mit dem Erreger der IBD zum Zeitpunkt der Untersuchung auszuschließen.

Zuverlässige diagnostische Methoden z.B. in Form von serologischen Nachweismethoden sind zwingend erforderlich, um in Beständen frühzeitig infizierte Tiere zu identifizieren und zu isolieren.

2 Literaturübersicht

2.1 Boid Inclusion body disease (IBD)

Bei den in Gefangenschaft gehaltenen Riesenschlangen der Familien Boidae und Pythonidae aber auch bei einigen anderen Schlangenarten tritt in Europa, Afrika und in den USA seit 1970 zunehmend häufiger die als Einschlusskörperchen-Krankheit (Inclusion Body Disease, IBD), bezeichnete Erkrankung auf.

Von der IBD betroffene Schlangen zeigen eine starke Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, Regurgitation, Inappetenz, zentralnervöse Störungen, Tortikollis, Anisokorie, Enteritis, Pneumonie sowie Häutungsschwierigkeiten. Erkrankte Tiere sterben nach Tagen, Wochen, Monaten oder auch erst nach Jahren. Als mögliche Infektionswege werden direkter Kontakt zwischen den Tieren, orale oder aerogene Infektionen oder Milben als Vektoren (*Ophionyssus sp.*) diskutiert (SCHUMACHER et al., 1994).

Charakteristisch für die IBD sind eosinophile intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in epithelialen Zellen der viszerale Organe, den Neuronen sowie teilweise in verschiedenen Blutzellen. Diese Einschlüsse sind amorph und bestehen vermutlich aus Protein. Im Elektronenmikroskop erscheinen sie elektronendicht und sind nicht von einer Membran umgeben. In einzelnen Fällen wurden virusartige Partikel in der Nähe der Einschlüsse beschrieben. Der Nachweis dieser Einschlüsse ist zurzeit Voraussetzung für die Diagnose dieser Krankheit. Obwohl die Ätiologie der IBD noch ungeklärt ist, handelt es sich nach bisherigem Stand der Forschung um eine Virus-bedingte Erkrankung. Forscher in den USA haben Retroviren bei betroffenen Tieren nachgewiesen. SCHUMACHER et al. (1994) und JACOBSON et al. (2001), konnten aber bisher keinen kausalen Zusammenhang zwischen dem Virusnachweis und der IBD nachweisen. In Deutschland wurden hingegen Reo- und Adenoviren aus betroffenen Schlangen isoliert (MARSCHANG, 2001).

Bisherige Empfehlungen für die Diagnose der IBD bei lebenden Tieren verlangen Biopsien von Leber, Niere oder den ösophagealen Tonsillen (JACOBSON et al., 1999). In Deutschland werden solche vorsorglichen Untersuchungen aufgrund des Risikos des Eingriffs, der dafür notwendig ist, äußerst selten unternommen. Zudem stimmen die meisten Besitzer einer solchen Biopsie und Untersuchung nicht zu. Häufig werden daher Blutausstriche zum Nachweis von Einschlusskörperchen herangezogen. Diese Methode ist jedoch nicht geeignet eine Infektion mit IBD zum Zeitpunkt der Probenentnahme auszuschließen.

2.1.1 Einschlusskörperchen-Erkrankung bei Schlangen (Serpentes)

Die Einschlusskörperchen-Erkrankung (eng. Inclusion body disease, IBD) wurde vor allem bei Riesenschlangen nachgewiesen (AXTHELM 1985; SCHUMACHER et al., 1992; CARLISLE-NOWAK et al., 1998; OROS et al., 1998, BOYER et al., 2000). Bei Lanzenottern (*Botriechis marchi*) wurden gleichartig aufgebaute Einschlüsse nachgewiesen (RAYMOND et al., 2001), dagegen konnten bei Kornnattern (*Pantheropsis gutatta*) und Kettennattern (*Lampropeltis spp.*) (FLEMING et al., 2003) zwar lichtmikroskopisch ähnliche Einschlüsse festgestellt werden, die bei elektronenmikroskopischer Untersuchung allerdings strukturelle Unterschiede zu den Einschlüssen bei der IBD aufwiesen.

Verschiedene Färbemethoden zur Darstellung und Charakterisierung der intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen wurden beschrieben (CARLISLE-NOWAK et al., 1998; OROS et al., 1998; SCHUMACHER, 1992; WOZNIAK et al., 2000).

Table 1: Anfärbbarkeit von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen.

Färbung	Reaktion	Autor
Giemsa	Dunkelblau	SCHUMACHER (2000)
Toluidin-blau	Orthochromatisch	WOZNIAK et al. (2000)
Schiff-Methylen-blau	Positiv	WOZNIAK et al. (2000)
Phosphorwolfram-Hämatoxylin	Positiv	SCHUMACHER (2000)
Hämatoxylin-Eosin	Eosinophil	CARLISLE-NOWAK et al. (1998) OROS et al. (1998) SCHUMACHER (1992) WOZNIAK et al. (2000)

Aufgrund der Anfärbbarkeit der Einschlüsse vermutet man, dass es sich bei den Einschlüssen um Virusproteinablagerungen handelt, die bei der Virusreplikation entstehen (WOZNIAK et al., 2000).

Bei einem Infektionsversuch wurde zellfreier Überstand aus einer primären Nierenzellkultur von einer erkrankten Abgottschlange (*Boa constrictor*) zwei Tigerpythons (*Python molurus*) injiziert. Die beiden Versuchstiere entwickelten ebenfalls IBD, aber es konnte kein Virus aus den Versuchstieren isoliert werden (SCHUMACHER, 1994). Bei einem ähnlichen Übertragungsversuch auf Abgottschlangen (*Boa constrictor*) konnte ein 68 kd-Protein dargestellt werden, das ausschließlich von den infizierten Tieren gebildet wurde. Das Protein wurde als spezifisch für IBD angesehen. Bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen der infizierten Tiere wurden Viruspartikel nachgewiesen, die sich morphologisch mit einem Durchmesser von 100-110 nm, einem elektronendichten Core, einem hexagonalen Kapsid und membranbehüllt darstellten. Es wurde vermutet, dass das verursachende Virus ein Retrovirus sei (WOZNIAK et al., 2000).

Tabelle 2: Nachweis von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen bei verschiedenen Schlangen.

Schlangenart	Klinik /Pathologie	Einschlüsse in	Nachweis	Autor
Kalifornische Königsnatter (<i>Lampropeltis getula californica</i>)	Lymphosarkom	Lymphosarkom	EM	JACOBSON et al. (1980)
Australische Pythons (<i>Morelia spilota variegata</i> , <i>Morelia spilota spilota</i>)	Anorexie, ZNS-Störungen, Tortikollis, Lähmungserscheinungen	Hepatozyten, Neuronen	LM	CARLISLE-NOWAK et al. (1998)
Pazifikboa (<i>Candoia carinata</i>)	Anorexie, Regurgitation, ZNS-Störungen	Pankreas, Hepatozyten, Neuronen	LM, EM	OROS et al. (1998)
Buntpython/Blutpython (<i>Python curtus</i>) Königspython (<i>Python regius</i>) Netzpython (<i>Python reticulatus</i>) Felsenpython (<i>Python sebae</i>) grüne Anakonda (<i>Eunectes murinus</i>) gelbe Anakonda (<i>Eunectes notaeus</i>) Schlangboa (<i>Epicrates striatus</i>) grüner Baumpython (<i>Chondropython viridis</i>) Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>) Madagaskabo (<i>Acrantophis madagascariensis</i>)		ZNS, Gastrointestinal-, Respirations- und Urogenitaltrakt	LM, EM	SCHUMACHER (1992)
Burmesische Pythons (<i>Python molurus bivittatus</i>), Netzpythons (<i>Python reticulatus</i>), Felsenpython (<i>Python sebae</i>), Grüner Baumpython (<i>Chondropython viridis</i>) Abgottschlangen (<i>Boa constrictor</i>)	ZNS-Störungen, Anorexie, Verlust motorischer Funktionen, Regurgitation, Lethargie, Pneumonie, Leukozytose	Gehirn, Rückenmark, Lunge, Leber, Niere, Milz, Pankreas, Darm, Blut	LM, EM	SCHUMACHER et al. (1994)
Abgottschlangen (<i>Boa constrictor</i>)	Regurgitation Mundfäule, Häutungsprobleme, ZNS-Störungen	Leber	EM	WOZNIAK et al. (2000)
Dunkler Tigerpython (<i>Python molurus bivittatus</i>)	Regurgitation, Salmonellose	Blut, Herz	LM, EM	JACOBSON et al. (2001)
Palmenlanzenotter (<i>Bothriechis marchi</i>)	Inappetenz, Lähmungserscheinungen, Regurgitation, Dehydratation	Hepatozyten, Nierenepithelien	LM, EM	RAYMOND et al. (2001)

- keine Angaben

EM elektronenmikroskopisch

LM lichtmikroskopisch

2.1.2 Klinische Symptome

Die klinischen Symptome der IBD sind sehr variabel. Erkrankte Schlangen zeigen starke Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens, Inappetenz, Regurgitation, zentralnervöse Störungen, Tortikollis, Anisokorie, Stomatitis, Enteritis, Pneumonie sowie Häutungsschwierigkeiten (CARLISLE-NOWAK et al., 1998; SCHUMACHER et al., 1994; WODZNIAK et al., 2000; JACOBSON et al., 2001; MARSCHANG et al., 2001). Häufig treten Sekundärfektionen mit *Salmonella* spp. auf (JACOBSON et al., 2001; SCHUMACHER et al., 1994).

2.1.3 Pathologische und histologische Befunde

Die Sektionsbefunde sind oft nicht aussagekräftig, da sekundäre bakterielle Infektionen in Form von Pneumonien, Stomatitiden, und bakteriellen Granulomen in Leber und Nieren das Bild bestimmen.

Histologisch werden eosinophile intrazytoplasmatische Einschlüsse in den Epithelien aller viszeralen Organe sowie in den Neuronen gefunden. Einschlüsse finden sich ebenfalls in den roten Blutzellen. In allen Schlangen mit ZNS-Störungen, wird eine Meningoencephalitis mit neuronaler Degeneration und perivaskulärer Infiltration angetroffen (JACOBSON et al., 1980; CARLISLE-NOWAK et al., 1998; SCHUMACHER et al., 1994).

2.2 Reovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Reptilienarten

2.2.1 Reovirusinfektionen bei Echsen (Sauria)

Der erste elektronenmikroskopische Nachweis eines Reovirus bei Reptilien erfolgte in einem Papillom einer Smaragdeidechse (*Lacerta viridis*). In dem Tier wurden zugleich ein Papillomavirus (*Papillomaviridae*) und ein Herpesvirus festgestellt. Das Reovirus und das Herpesvirus waren wahrscheinlich nur Zufallsbefunde (RAYNAUD und ADRIAN, 1976).

Ein Grüner Leguan (*Iguana iguana*, Tagebuch-Nr. 1523/93), der zwei Wochen nach dem Erwerb gestorben war, zeigte vorher lediglich Anorexie. Ein Reovirus wurde aus Leber und Milz auf VH2-Zellkulturen bei 28 °C isoliert und elektronenmikroskopisch identifiziert (BLAHAK, 1993).

Ein weiterer Grüner Leguan (*Iguana iguana*, Tagebuch-Nr. 1118/84), starb ebenfalls zwei Wochen nach dem Erwerb und zeigte vorher nur Anorexie und Somnolenz. Aus Leber und Darm wurde ein Reovirus auf HEF-Kulturen bei 28 °C isoliert und elektronenmikroskopisch identifiziert (BLAHAK und OTT, 1994b).

2.2.2 Reovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)

Ein Reo-ähnliches Virus wurde von Chinesischen Vipernschlangen (*Azemiops feyi*), die kurz nach dem Erwerb gestorben waren, aus Leber und Milz auf Viper-Herz-Zellkulturen (VH2) bei 25 °C isoliert. Elektronenmikroskopisch konnten ebenfalls Reovirus-ähnliche Partikel aus Dünndarm und infizierten VH2 festgestellt werden (JACOBSON, 1986).

Aus einem Königspython (*Python regius*, PR/82) wurde ein Reovirus aus Niere, Leber und Milz auf Iguana-Herz-Zellkulturen (IgH2) bei 28-30 °C isoliert. Dieser Python zeigte bei einer pathologisch-anatomischen Untersuchung hämorrhagische Läsionen in den Nieren. Es gibt keine Angaben über Symptome vor dem Tod (AHNE et al., 1987).

Bei einem Grünen Hundkopfschlinger (*Corallus caninus*, 109/90) wurde aus Enddarm und Niere ein Reovirus auf primären Schildkröten-Zellkulturen, VH2- und Hühnerembryo-fibroblasten- (HEF-)Kulturen bei 28 °C isoliert und elektronenmikroskopisch nachgewiesen. Dieses Tier wurde tot aufgefunden, ohne vorher irgendwelche Symptome einer Erkrankung zu zeigen. Die Sektion zeigte keine pathologischen Befunde. Histologisch wurde nur eine diffuse Vakuolisierung der Leberzellen festgestellt (BLAHAK und GÖBEL, 1991).

Eine Äskulapnatter (*Elaphe longissima*, Tagebuch-Nr. 5327/91), die während eines Seuchenzuges einer Paramyxovirus (PMV)-Infektion in einem Zoo starb, zeigte wie alle anderen Tiere Pneumonie und ZNS-Symptome. Es wurde ein Reovirus aus Enddarm und Niere auf VH2-Zellkulturen bei 28 °C isoliert und elektronenmikroskopisch identifiziert (BLAHAK, 1993).

ZNS-Symptome, wie Inkoordination, Gleichgewichtsstörungen und Krämpfe, so dass sich der ganze Körper einringelte, zeigte eine Prärieklapperschlange (*Crotalus viridis*, CV/94), aus deren Hirn ein Reovirus auf Vero-Zellkulturen bei 30 °C isoliert wurde. Dieses Tier stammte aus einer Zucht von 20 Crotalidae und Viperidae, wovon 15 die oben genannten Symptome zeigten und 10 davon starben. Die Schlange, aus der das Reovirus isoliert wurde, musste zwei Wochen nach Auftreten der klinischen Symptome euthanasiert werden, da ein Therapieversuch erfolglos war (VIELER et al., 1994).

In einer Gruppe von Königsnattern (*Lampropeltis pyromelana*) wurde ein Reovirusausbruch beschrieben, bei dem die Reoviren als Verursacher einer Darmentzündung angesehen wurden (REAVILL et al., 2003).

Einen Überblick über die Reptilien, bei denen Reovirusinfektionen bisher nachgewiesen wurden, die damit verbundenen Krankheitsbilder sowie die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen gibt Tabelle 3.

Tabelle 3: Nachweis von Reoviren bei verschiedenen Reptilienspezies.

Reptilienart	Klinik / Pathologie	Nachweis von Reovirus aus	Nachweis- methode	Autor
Smaragd-Eidechse (<i>Lacerta viridis</i>)	Papillom	Papillom	EM	RAYNAUD und ADRIAN (1976)
Chinesische Viperschlange (<i>Azemiops feyi</i>)	Gestorben	Leber, Milz	IS, EM (VH2)	JACOBSON (1986)
Königspython (<i>Python regius</i>)	hämorrhagische Läsionen in den Nieren	Niere, Leber, Milz	IS (IgH2)	AHNE et al. (1987)
Boide Schlangen	Enzephalitis, chronisch- proliferative Pneumonie, tot	Nervengewebe, Lunge	IS	AXTHELM (1989)
Grüner Hunds- kopfschlinger (<i>Corallus caninus</i>)	tot gefunden	Enddarm, Niere	IS, EM (VH2, HEF)	BLAHAK und GÖBEL (1993)
Äskulapnatter (<i>Elaphe longissima</i>)	Pneumonie	Enddarm, Niere	IS, EM (VH2)	BLAHAK (1993)
Grüner Leguan (<i>Iguana iguana</i>)	Anorexie, tot	Leber, Milz	IS, EM (VH2)	BLAHAK (1993)
Grüner Leguan (<i>Iguana iguana</i>)	Inappetenz, Somnolenz, tot	Leber, Darm	IS, EM (HEF)	BLAHAK und OTT (1994)
Prärieklappers- schlange (<i>Crotalus viridis</i>)	ZNS-Symptome	Gehirn	IS, EM (Vero)	VIELER et al. (1994)
Grüner Leguan (<i>Iguana iguana</i>)	Pneumonie, ZNS- Symptome	-	IS, VNT	BLAHAK (1995)
Rattennatter (<i>Elaphe sp.</i>)	Pneumonie	-	IS, VNT	LAMIRANDE (1999)
Maurische Landschildkröte (<i>Testudo graeca</i>)	Kachexie, Splenomegalie, Nekrose des Zungenepithels	Zunge, Lunge, Leber, Ösophagus, Niere	IS (VH2)	MARSCHANG (2000)
Indischer Dorn- schwanzagame (<i>Uromastyx hardwickii</i>)	Inappetenz, Lungenblutungen	-	IS	DRURY et al. (2002)
Königsnatter (<i>Lampropeltis pyromelana</i>)	Enteritis	Darm	-	REAVILL et al. (2003)

- keine Angaben

2.3 Schlangenarten, aus denen Reoviren isoliert und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden

2.3.1 Boiden

Die Organe von 12 Boas aus Deutschland, die an IBD erkrankt waren, wurden auf das Vorhandensein von zytopathogenen Viren untersucht. Die Tiere stammten von drei verschiedenen Haltern. Einen Überblick über die Schlangen, bei denen Reoviren isoliert wurden, die damit verbundenen Krankheitsbilder sowie die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen gibt Tabelle 4.

Tabelle 4: Isolation von Reoviren aus Abgottschlangen (*Boa constrictor*).

Bestand	Klinik / Pathologie	Reovirus-isolierung aus	Isolat-Nr.	Nachweis (Zellkultur)	Autor
A	ZNS-Symptome, Enteritis, Stomatitis, Euthanasie	Blut	Ohne	VH2	MARSCHANG et al. (2001)
A	keine Angaben	Blut	Ohne	VH2	MARSCHANG et al. (2001)
B	ZNS-Symptome, Euthanasie	Leber	ReoV 26/00	VH2	MARSCHANG et al. (2001)

2.4 Adenovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Reptilienarten

Adenoviren wurden sehr häufig bei den verschiedenen Reptilienarten, bei Krokodilen, Schlangen und Echsen nachgewiesen. Dabei ist oft unklar, ob die Adenoviren pathogen waren. Häufig kommen sie in Zusammenhang mit anderen Erregern vor, so dass eine Funktion als opportunistische Erreger oder bei der Schwächung des Immunsystems diskutiert wird. Dazu sollen Reptilienadenoviren sich mit ihren Wirten entwickelt haben, und deshalb sehr gut an ihren Reptilienwirte angepasst sein (WELLEHAN et al., 2004).

2.4.1 Adenovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)

Adenoviren wurden aus einer Boa Constrictor (*Boa constrictor*) (JACOBSON et al., 1985), aus einem Königspython (*Python regius*) (OGAWA et al., 1992) und aus einer Kornnatter (*Pantherophis gutatta*), welche klinische Symptome einer Pneumonie zeigte und starb (JUHASZ und AHNE, 1992), isoliert.

Aus einer Rosenboa (*Lichanura trivirgata*) konnte in histopathologischen Schnitten licht- und elektronenmikroskopisch Adenoviren nachgewiesen werden (SCHUMACHER et al., 1994).

Adenovirus-DNS konnte aus der Leber einer Boa Constrictor (*Boa constrictor*) und aus dem Darmtrakt einer Klapperschlange (*Crotalus scutulatus scutulatus*) mit Dermatitis nachgewiesen werden (RAMIS et al., 2000; PERKINS et al., 2001).

2.4.2 Adenovirusinfektionen bei Echsen (Sauria) und Krokodilen (Crocodylia)

Adenoviren konnten in histopathologischen Schnitten licht- und elektronenmikroskopisch bei unterschiedlichen Arten von Echsen nachgewiesen werden. Bei Unterarten der Bartagamen

(*Amphibolurus barbatus*, *Pogona henrylawsoni* und *vitticeps*) werden häufig Adenovirusinfektionen festgestellt (JULIAN und DURHAM, 1982; FRYE et al., 1994; JACOBSON et al., 1996; BOYER und FRYE, 2000; KIM et al., 2002). Auch beim Nilkrokodil (*Crocodylus niloticus*), Steppenwaran (*Varanus exanthematicus*), Jackson's Chameleon (*Chamaeleo jacksoni*) und Bergchamäleon (*Chamaeleo montium*) wurden Adenoviren nachgewiesen (JACOBSON et al., 1984; JAKOBSON und KOLLIAS, 1986; JAKOBSON und GARDINER, 1990; KINSEL et al., 1997). Bei sieben verschiedenen Echsen konnten sechs Adenoviren detektiert und analysiert werden (WELLEHAN et al., 2004).

Einen Überblick über die Reptilienspezies, bei denen Adenovirusinfektionen bisher nachgewiesen wurden, die damit verbundenen Krankheitsbilder sowie die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Nachweise von Adenoviren bei verschiedenen Reptilien.

Reptilienart	Klinik / Pathologie	Adenovirus-isolierung aus	Nachweis	Autor
Nilkrokodil (<i>Crocodylus niloticus</i>)	Untergewicht, Lebernekrosen	Darm	Histologie, EM	JACOBSON et al. (1984)
Aeskulapschlange (<i>Zamenis longissimus</i>)	Stomatitis	-	EM	HELDSTAB und BESTETTI (1984)
Boa constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	Hepatitis, Pneumonie, Regurgitation, Torticollis	-	EM	JACOBSON et al. (1985)
Steppenwaran (<i>Varanus exanthematicus</i>)	Hepatitis, Anorexie, Opisthotonus	Herz	Histologie, EM, PCR	JACOBSON und KOLLIAS (1986)
Jackson's Chamäleon (<i>Chamaeleo jacksoni</i>)	Hepatitis, Anorexie, Opisthotonus, ZNS- Symptome	-	Histologie, EM, PCR	JACOBSON und GARDINER (1990)
Königspython (<i>Python regius</i>)	Gestorben	Herz, Leber, Niere	Isolierung in IgH2	OGAWA et al. (1992)
Kornnatter (<i>Pantheropsis gutatta</i>)	Pneumonie, tot	Leber, Milz, Niere	Isolierung in IgH2	JUHASZ und AHNE (1992)
Agame (<i>Pogona henrylawsoni</i>)	Hepatitis, Anorexie, Opisthotonus, ZNS- Symptome	-	Histologie, EM, PCR	FRYE et al. (1994)
Rosenboa (<i>Lichanura trivirgata</i>)	Hepatitis, Pneumonie, Regurgitation, Torticollis	Niere, Lunge, Herz	EM	SCHUMACHER et al. (1994)
Bartagame (<i>Pogona vitticeps</i>)	-	Darm	EM	JACOBSON et al. (1996)
Bergchameleon (<i>Chamaeleo montium</i>)	-	Darm	EM	KINSEL et al. (1997)
Californische Königsnattern (<i>Lampropeltis zonata</i> <i>multizinata</i>)	Gastroenteritis	Darm	EM	WOZNIAK et al. (2000)
Boa constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	Leber	In situ Hybridisation	RAMIS et al. (2000)
Palmen Vipern (<i>Bothreichis marchi</i>)				RAYMOND et al. (2002)
Bartagame (<i>Pogona vitticeps</i>)	ZNS-Symptome, Torticollis	Darm	EM	KIM et. al. (2002)
Kalifornische Königsnatter (<i>Lampropeltis zonata</i>)	Degenerative Encephalopathie	Gehirn	EM In situ- Hybridisation	RAYMOND et al. (2003)
Blauzungenskink Leopardgecko Fettschwanzgecko Bergchameleon Gila monster Tokaygecko	-	-	PCR	WELLEHAN et al. (2004)

- keine Angaben

2.4.3 Klinische Symptome

Es sind eine Reihe von Symptomen bei Reptilien mit Adenovirusinfektionen beschrieben worden. Einige Tiere starben ohne vorher Anzeichen einer Erkrankung zu zeigen. Bei infizierten Tieren wird häufig Anorexie beobachtet, die auch mit Lethargie assoziiert sein kann.

Zentralnervöse Störungen in Verbindung mit Torticollis werden beschrieben (JACOBSON et al., 1985; JACOBSON und GARDINER, 1990; KIM et al., 2002). In einigen Fällen werden Stomatitis (HELDSTAB und BESTETTI, 1984) und Dermatitiden (PERKINS et al., 2001) beschrieben. Bei Unterarten der Bartagamen (*Pogona barbata*, *Pogona henrylawsoni* und *vitticeps*) scheint ein Zusammenhang zwischen Hepatitiden und erhöhter Jungtiersterblichkeit zu bestehen.

2.4.4 Pathologische und histologische Befunde

Pathologische Befunde bei Reptilien mit Adenovirusinfektionen sind unspezifisch. Regelmäßig werden Veränderungen der Leber in Form von Petechien oder vereinzelt blassen Bereichen beschrieben (JACOBSON et al., 1985; JACOBSON und KOLLIAS, 1986; JACOBSON et al., 1984; SCHUMACHER et al., 1994).

Histologisch finden sich Lebernekrosen. Auch werden Veränderungen des Intestinaltraktes gefunden. Das Duodenum zeigt sich dilatiert mit einer Hyperämie der Mukosa (HELDSTAB und BESTETTI, 1984). Basophile intranukleare Einschlüsse werden in Hepatozyten gefunden, sie sind assoziiert mit nekrotischen Bereichen. Sie werden aber auch in Enterozyten (HELDSTAB und BESTETTI, 1984; JACOBSON et al., 1984; KINSEL et al., 1997; JACOBSON et al., 1996; PERKINS et al., 2001; KIM et al., 2002), Myocardepithelzellen (JACOBSON und KOLLIAS, 1986), Nierenepithelzellen (JULIAN und DURHAM, 1982; SCHUMACHER et al., 1994), im Endocard und Epithelzellen der Lunge (SCHUMACHER et al., 1994) gefunden.

2.5 Schlangenarten, aus denen Adenoviren isoliert und im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden

2.5.1 Boiden

Die Organe von 12 Boas aus Deutschland, die an IBD erkrankt waren, wurden auf das Vorhandensein von zytopathogenen Viren untersucht. Die Tiere stammten von drei verschiedenen Besitzern. Bei den Tieren eines Besitzers handelte es sich dabei um ein Muttertier mit ihren neun Jungtieren, die etwa 4 Monate alt waren. Insgesamt sieben der Tiere zeigten klinische Symptome wie ZNS-Störungen, Stomatitis und Enteritis (MARSCHANG et al., 2001).

Aus zwei Tieren, die ZNS-Symptome zeigten und euthanasiert wurden, konnten aus verschiedenen Organen, Niere, Leber und Blutzellen, Adenoviren isoliert werden.

Tabelle 6: Isolation von Adenoviren bei Abgottschlangen (*Boa constrictor*).

Bestand	Klinik / Pathologie	Adenovirus-isolierung aus	Isolat-Nr.	Nachweis (Zellkultur)	Autor
A	ZNS-Symptome, Euthanasie	Blut	-	VH2	MARSCHANG et al. (2001)
C	ZNS-Symptome, Euthanasie	Leber	-	VH2	MARSCHANG et al. (2001)

- keine Angabe

2.6 Retrovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Schlangenarten

Retroviruspartikeln und auch -isolate sind in einzelnen Fällen bei Reptilien beschrieben worden. In Vergleich dazu gibt es relativ viele Untersuchungen, die sich mit dem Vorkommen retroviraler Sequenzen in den Organen von verschiedenen Tieren, u.a. bei Reptilien befassen. Hierbei geht es in der Regel um endogene Retroviren. Die klinische Bedeutung dieser Retroviren für die Reptilien ist noch nicht geklärt.

2.6.1 Retrovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)

Es gibt einige Berichte über Retrovirusnachweise bei Schlangen. Häufig werden retrovirusartige Partikel bei Schlangen mit Neoplasien gefunden, aber auch bei Schlangen mit IBD. Retrovirale Partikel vom C-Typ wurden erstmals bei einem Kettenviper (*Vipera russelli*) nachgewiesen (ZEIGEL und CLARK, 1969), danach in einer Kornnatter (*Pantherophis guttata*) mit einem Rhabdomyosarkom (Lunger et al., 1974), einer Russell's Viper (*Vipera russelli*) mit einem Myxofibrom (Lunger et al., 1974), in zwei Abgottschlangen (*Boa constrictor*) welche an Erythroleukose erkrankt waren (IPPEN et al., 1978), in einer Kettennatter (*Lampropeltis getula californica*) (JACOBSON et al., 1980), in einer Vierstreifennatter (*Elaphe obsoleta quadrivittata*) (ZSCHIESCHE et al., 1989), bei Pythons (*Python molurus bivittatus*) mit zentral nervösen Störungen und verschiedenartigen Neoplasien sowie Abgottschlangen (*Boa constrictor*), welche zentralnervöse Störungen zeigten (SCHUMACHER et al., 1994, JAKOBSON et al., 2001), nachgewiesen. In zwei Pythons (*Python molurus* und *Python curtus*) konnten ebenfalls retrovirale Sequenzen nachgewiesen werden (HUDER et al., 2002).

Tabelle 7: Nachweis von Retroviren bei verschiedenen Schlangenarten.

Schlangenart	Klinik / Pathologie	Retrovirus-Nachweis aus	Nachweis	Autor
Kettenviper (<i>Vipera russelli</i>)	Myxofibrom	Milz	Primäre Zellkultur und EM	ZEIGEL und CLARK (1969)
Kornnatter (<i>Pantheropsis gutatta</i>)	Rhabdomyosarkom	Rhabdo-myosarkom	EM	LUNGER et al. (1974)
Russell's Viper (<i>Vipera russelli</i>)	Myxofibrom	Milz	EM	LUNGER et al. (1974)
Kettennatter (<i>Lampropeltis getulua californica</i>)	Lymphosarkom	Tumorzellen	EM	JACOBSON et al. (1980)
Boa constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	Erythroleukose	Tumorzellen	EM	IPPEN et al. (1982)
Vierstreifennatter (<i>Elaphe quatuorlineata</i>)	Lymphosarkom	Tumorzellen	-	ZSCHIESCHE et al. (1988)
Burmesischer Python (<i>Python molurus bivittatus</i>)	IBD	Leber	EM	SCHUMACHER et al. (1994)
Boa constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	IBD	Leber	EM	SCHUMACHER et al. (1994)
3 Boa constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	IBD	Blut	EM	JACOBSON et al. (2001)
4 Burmesische Python (<i>Python molurus bivittatus</i>)	Fibrosarkom, Lymphosarkom, Adenokarzinom, Nierentumor	Tumorzellen	EM	Chandra et al. (2001)
Burmesischer Python (<i>Python molurus bivittatus</i>) Python (<i>Python curtus</i>)	IBD	Blut	PCR	HUDER et al. (2002)
Hundskopfschlinger Boa (<i>Corallus caninus</i>)	Adenokarzinom	Tumorzellen	EM	OROS et al. (2004)

- keine Angaben

2.6.2 Klinische Symptome

Es sind eine Reihe von Symptomen bei Schlangen mit Retrovirusinfektionen beschrieben worden. In vielen Fällen werden Neoplasien in Form von Fibrosarkomen, Lymphosarkomen, Adenokarzinomen, Rhabdomyosarkomen und Myxofibromen (LUNGER et al., 1974; KONSTANTINOV et al., 1982; CHANDRA et al., 2001) beschrieben. Bei manchen Riesenschlangen mit IBD welche zentralnervöse Störungen zeigten, wurden Retroviren oder retrovirusartige Partikel nachgewiesen (SCHUMACHER et al., 1994; JAKOBSON et al., 2001) und auch retrovirale Sequenzen (HUDER et al., 2002).

2.7 Paramyxovirusinfektionen bei Reptilien: Vorkommen und Krankheitsbilder bei verschiedenen Reptilienarten

Ophidian Paramyxoviren (oPMV) werden bei einer Reihe von Schlangengattungen gefunden, konnten aber auch bei Echsen nachgewiesen werden. Sie kommen besonders häufig bei Schlangen der Gattung Viperidae vor, wo sie als Erreger der wichtigsten Infektionskrankheit gelten. Aber auch bei Colubriden, Elaphen und Boiden werden oPMV nachgewiesen.

2.7.1 Paramyxovirusinfektionen bei Schlangen (Serpentes)

Paramyxovirusinfektionen können bei nahezu allen Schlangengattungen festgestellt werden, wobei die betroffenen Schlangen respiratorische Krankheitssymptome wie Pneumonien mit bakteriellen Sekundärinfektionen, neurologische Krankheitssymptome wie Tremor, Gleichgewichtsstörungen und Opisthotonus zeigen. Die Infektion tritt vor allem bei Giftschlangen auf, aber auch ungiftige Nattern oder Riesenschlangen können betroffen sein (BLAHAK et al., 1991; OROS et al., 2001; WEST et al., 2001).

Paramyxoviren wurden erstmals aus einer Lanzenschlange (*Bothrops atrox*) (FÖLSCH und LELOUP, 1976) isoliert. Aus einer Felsenklapperschlange (*Crotalus lepidus*), die unter ZNS-Symptomen einging (JACOBSON et al., 1980a), aus einer Spitzkopfnatter (*Elaphe oxycephala*) (AHNE et al., 1987a) und aus Ottomanvipern (*Vipera xanthena xanthena*) (POTGIETER et al., 1987) konnten ebenfalls Paramyxoviren isoliert werden. Ein weiteres Paramyxovirus konnte aus einem Königspython (*Python regius*) (AHNE und NEUBERT, 1991) isoliert werden.

Einen Überblick über die Schlangen, bei denen Paramyxovirusinfektionen bisher nachgewiesen wurden, die damit verbundenen Krankheitsbilder sowie die Ergebnisse weiterführender Untersuchungen gibt Tabelle 8.

2.7.2 Paramyxovirusinfektionen bei Echsen (Sauria)

Paramyxoviren können auch bei Echsen nachgewiesen werden (AHNE und NEUBERT, 1991; MARSCHANG et al., 2002; JACOBSON et al., 2001). In diesen Fällen ist die pathogene Bedeutung der PMV noch unbekannt. Im Zusammenhang mit mehreren Todesfällen bei Krokodiltejus (*Dracaena guinanensis*) konnte die Beteiligung von Paramyxoviren an proliferierenden Pneumonien bei mehreren Tieren nachgewiesen werden (JACOBSON et al., 2001).

Tabelle 8: Nachweis von Paramyxoviren bei verschiedenen Schlangen.

Reptilienart	Klinik / Pathologie	Paramyxo- Virus- Isolierung aus	Nachweis- methode	Autor
Lanzenschlange (<i>Bothrops atrox</i>)	ZNS-Symptome, Pneumonie	Lungengewebs- suspension	Gecko- und Schlangen- ZK	FÖLSCH und LELOUP (1976)
Felsenklapperschlange (<i>Crotalus lepidus</i>)	ZNS-Symptome	Lunge	VH2	JACOBSON et al. (1980a)
Spitzkopfnatter (<i>Elaphe oxycephala</i>)	-	Organpool	IgH2	AHNE et al. (1987a)
Ottomanvipern (<i>Vipera xanthena xanthena</i>)	Pneumonie	Lungen	Fisch-ZK	POTGIETER et al. (1987)
Königspython (<i>Python regius</i>)	-	-	IgH2	AHNE u. NEUBER (1991)
Viperidae, Crotalidae, Elapidae und Colubridae	Pneumonie, Gleichgewichts- störungen, Opithotonus	Lungen und Nieren verschiedener Schlangen	VH2	BLAHAK et al. (1991)
Grubenotter (<i>Agkistrodon b. taylori</i>)	Pneumonie	Lungen	Immunhisto- chemie, VH2	HOMER et al. (1995)
Grubenottern (<i>Crotalus d. terrificus</i>) Busch-Viper (<i>Atheris sp.</i>)	Pneumonie	Lungen	VH2	RICHTER et al. (1996)
Natter (<i>Lampropeltis sp.</i>) Viper (<i>Bitis nasicornis</i>) Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>) Königspython (<i>Python regius</i>)	-	-	PCR	AHNE et al. (1999)
Buschviper (<i>Cerastes cerastes</i>) (<i>Atheris desaixi</i>) Natter (<i>Elaphe situla</i>) Grubenotter (<i>Trimeresurus flavomaculatus</i>)	-	-	PCR	FRANKE et al. (2001)
Verschiedene Schlangen Spezies aus verschiedenen spanische Haltungen	Respiratorische Infektionen	Lunge, Leber	Immunohistochemie	OROS et al. (2001)
Boelen's Python (<i>Morelia boeleni</i>)	Meningo-encephalitis	Gehirn und ösophageales Ganglion	In situ-Hybridisierung	WEST et al. (2001)

- keine Angaben

2.7.3 Klinische Syntome

Klinische Symptome bei oPMV-infizierten Schlangen stellen sich häufig als respiratorische und zentralnervöse Störungen dar. Sie können auftreten in Verbindung mit vermehrtem Speichel, Schleim oder Blut in der Mundhöhle, Verknotungen, Regurgitation, Convulsionen, abnormalem Verhalten, Gleichgewichtsstörungen und Opisthotonus (FOELSCH und LELOUP, 1976;

POTGIETER et al., 1987; BLAHAK et al., 1991; JACOBSON et al., 1992; JACOBSON et al., 1997).

2.7.4 Pathologische und histologische Befunde

Pathologische Befunde sind Verlegungen der Lungen mit serösem Exudat im Lumen der Lungen und Luftsäcke, Verdickungen und Lungenödeme (POTGIETER et al., 1987; OROS et al., 2001; JACOBSON, 1989). Regelmäßig stellt sich eine Veränderung der Leber mit Hepatomegalie und weißen Knoten im Leberparenchym dar (JACOBSON et al., 1992; OROS et al., 2001) sowie Vergrößerung des Pankreas (JAKOBSON, 1989). Die Veränderungen der Lunge sind typisch aber nicht pathognomisch für oPMV-Infektionen (HOMER et al., 1995).

Histologisch sind oPMV-Infektionen durch proliferative Lungenerkrankungen charakterisiert. Lymphozyten und Heterophile infiltrieren das Interstitium (JACOBSON et al., 1992; OROS et al., 2001). Es wird eine Hyperplasie und Hypertrophie der septalen und alveolaren Epithelzellen beobachtet. Diese Zellen enthalten eosinophile intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen (OROS et al., 2001). In Fällen in denen ZNS-Störungen vorlagen, ist eine Demyelinisierung und Degeneration der Axone mit Auftreibung der Axonabschnitte beschrieben sowie eine Meningoencephalitis mit eosinophilen intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in Gliazellen (JACOBSON, 1989; WEST et al., 2001).

2.8 Das Reovirus

2.8.1 Klassifizierung

Die Familie *Reoviridae* wird in verschiedene Genera unterteilt (ICTV, 2003). Es wurden bisher zwölf Genera in der Familie *Reoviridae* (respiratory-enteric orphan) beschrieben (ICTV, 2003):

Orthoreovirus

Orbivirus

Rotavirus

Coltivirus

Seadornavirus

Aquareovirus

Idnoreovirus

Cypovirus

Fijivirus

Phytoreovirus

Oryzavirus

Mycoreovirus

2.8.1.1 Orthoreovirus

Orthoreoviren können nur Wirbeltiere infizieren, wie z.B. Vögel, Rinder, Menschen, Affen, Schafe, Schweine, Fledermäuse und Reptilien. Sie verbreiten sich horizontal über den Respirationstrakt oder auf oro-fäkalem Wege, ohne dass arthropode Vektoren involviert werden. Das Genom der Orthoreoviren besteht aus 10 dsRNS-Segmenten (WOOD et al., 1980; HORZINEK, 1985; ICTV, 2003). Das Genus Orthoreovirus wird in fünf Spezies eingeteilt. Reoviren der Mammalia, aviäre Reoviren, Neson Bay-Virus, Babbon-Reovirus und Reptilien-Reovirus sind bekannt. Alle Mitglieder der bisher anerkannten Spezies, ausser dem Reovirus der Mammalia, induzieren die Bildung von Synzytien in empfänglichen Zellkulturen. Die Eigenschaft, Synzytien zu bilden, ist für unbehüllte Viren ungewöhnlich, da ihnen das bei behüllten Viren dafür verantwortliche Glykoprotein fehlt. Nach Endozytose der Reoviruspartikel werden in die Plasmamembran der infizierten Zelle Glukoproteine eingebaut, welche zur Fusion der benachbarten Zellen führen (DUNCAN et al., 1996; NI und RAMIG, 1993; SHMULEVITZ und DUNCAN, 2000). Alle bisher bei Reptilien nachgewiesenen Reoviren wurden vorläufig den Orthoreoviren zugeordnet.

2.8.2 Eigenschaften der Orthoreoviren

2.8.2.1 Morphologie

Orthoreoviren sind unbehüllte, sphärische Partikel mit ikosaedrischer Symmetrie. Sie haben einen Durchmesser von 60-80 nm. Die Virionen werden aus zwei Teilen aufgebaut. Der innere Teil wird als Core bezeichnet und beinhaltet die 10 dsRNS-Segmente, er wird von einer doppelten Eiweißschicht, dem Kapsid, umgeben. Im Core sind eine Transkriptase und andere Enzyme angesiedelt. Cores haben 12 Fortsätze an den Stellen ihrer fünffachen Symmetrieachsen, die bis zur äußeren Fläche der Virionen reichen. Die Viruspartikel enthalten insgesamt 6-10 strukturelle Polypeptide (ICTV, 2003).

2.8.2.2 Nukleinsäure (Genom)

Das Genom der Orthoreoviren besteht aus zehn Segmenten linearer doppelsträngiger Ribonukleinsäure (dsRNS). Das Molekulargewicht dieser Segmente liegt zwischen 0,6 und 2,7 x 10⁶ Dalton. Das gesamte Molekulargewicht des Genoms beträgt ca. 12 bis 20 x 10⁶ Dalton. Die Virionen bestehen zu 15 bis 20 % aus RNS (ICTV, 2003).

2.9 Das Adenovirus

2.9.1 Klassifizierung

Es wurden bisher vier Genera in der Familie der *Adenoviridae* beschrieben (ICTV, 2003):

Mastadenovirus

Aviadenovirus

Atadenovirus

Siadenovirus

2.9.1.1 Atadenovirus

Atadenoviren wurden aus verschiedenen Wirbeltieren isoliert, aus Rindern (Subgenus D, E), Schafen, Hirschen, Enten, Hühnern (Egg-Drop-Syndrom), Opossums und Schlangen (BENKÖ und HARRACH, 1998; FARKAS et al., 2002). Phylogenetische Analysen der Genome verschiedener Atadenoviren haben zu der These geführt, dass diese Viren sich mit den Reptilien entwickelt haben. Ihr Vorkommen bei anderen Arten soll demzufolge einen neueren Wirtswechsel zu verdanken sein. Dies könnte auch erklären, warum Adenovirusinfektionen bei Reptilien so weit verbreitet sind und warum solche Infektionen in manchen Fällen keine deutlichen klinischen Symptome verursachen (HARRACH, 2000; WELLEHAN et al., 2004).

2.9.2 Eigenschaften der Adenoviren

2.9.2.1 Morphologie

Adenoviren sind unbehüllte, sphärische Partikel mit ikosaedrischer Symmetrie. Sie haben einen Durchmesser von 70-90 nm. Das unbehüllte Nukleokapsid trägt 252 kugelförmige Kapsomere, die regelmäßig verteilt sind. Dabei wird jedes Kapsomer von sechs Nachbarkapsomeren (Hexone) umgeben. Eine Ausnahme bilden die 12 Eckkapsomeren (Pentome) des Ikosaeders, die nur fünf Nachbarn haben. Jedes Penton besitzt auf dem Vertex-Kapsomer (Pentonbasis) eine Antenne mit einem Endkopf (Fiber), deren Länge variiert (BENKÖ et al., 2005).

2.9.2.2 Nukleinsäure (Genom)

Das Genom der Adenoviren besteht aus doppelsträngiger, linearer DNS mit einer Länge von 26000 bis 45000 Basenpaaren. An die beiden 5'-Enden des Genoms ist über einen Serinrest je ein terminales Protein kovalent gebunden, welche über nichtkovalente Wechselwirkungen miteinander interagieren können, so erhält das DNS-Genom einen quasizirkulären Zustand (ICTV, 2003).

2.10 Das Retrovirus

2.10.1 Klassifizierung

Anhand elektronenmikroskopischer Untersuchungen werden die retroviralen Partikel in vier Klassen eingeteilt, die mit den Buchstaben A, B, C und D bezeichnet werden. Diese Klassifikation berücksichtigt lediglich die als Onkoviren bezeichnete Gruppe von Viren. Die Einteilung der Retroviren erfolgt mittels bestimmter Merkmale, Form und Lokalisation des Nukleokapsids, Form der Hüllproteine und der Art des Zusammenlagerns der Virusbestandteile.

Die Familie *Retroviridae* wird in zwei Subfamilien, die *Orthoretrovirinae* und die *Spumaretrovirinae* mit sieben Genera eingeteilt (LINIAL et al., 2005).

Subfamilie *Orthoretrovirinae*

Alpharetrovirus

Betaretrovirus

Gammaretrovirus

Deltaretrovirus

Epsilonretrovirus

Lentivirus

Subfamilie *Spumaretrovirinae*

Spumavirus

Eine andere Art der Einteilung der Retroviren erfolgt in Abhängigkeit ihres Übertragungsmodus. Man unterscheidet exogene und endogene Retroviren. Die endogenen Retroviren sind in die Keimbahn integriert und werden vertikal (germinal) übertragen, die exogenen Retroviren werden dagegen horizontal durch Infektion übertragen.

2.10.2 Eigenschaften der Retroviren

2.10.2.1 Morphologie

Retroviren besitzen eine lipidhaltige Hülle und haben einen Durchmesser von etwa 80-100 nm. Retroviren enthalten einzelsträngige RNS. Auf der Partikeloberfläche einer Reihe von Virusarten der Familie befinden sich Projektionen in Knopf-(nobs) oder gestielter Form (spikes). Der Innenkörper des Virion (core) hat eine kubische Symmetrie und umschließt einen länglichen, wahrscheinlich helikalen Nukleoproteinstrang. Die Schale des Innenkörpers (core shell) besteht aus einer membranähnlichen Struktur (DOERR und GERLICH, 2002).

2.10.2.2 Nukleinsäure (Genom)

Das Genom der Retroviren besteht aus zwei Kopien einzelsträngiger RNS (ssRNS), die mit der 5'-Cap-Struktur und der 3'-Polyadenylierung die Form einer eukaryontischen mRNA aufweist (MODROW et. al., 2003). Je nach Virustyp kann die RNS von 7000 bis 12000 Basen lang sein. Das Genom kann in kodierende und terminale, nichtkodierende Anteile, welche im Sinne einer cis-Regulation für die Replikation von Bedeutung sind, unterteilt werden. Bei Viren mit sogenanntem einfachen Genom besteht der kodierende Anteil aus vier Abschnitten, den gag-, pro-, pol und env-Genen, während bei Viren mit komplexen Genom (Delta-, Epsilon-, Lenti- und Spumaviren) zusätzliche Gene für regulatorische Proteine vorhanden sind. Das

gag-Gen kodiert für die Strukturproteine (Matrix, Capsid und Nukleocapsid), das pro-Gen kodiert für die Protease, das pol-Gen kodiert für virale Enzyme (Polymerase, Reverse Transkriptase, RNaseH und Integrase) und das env-Gen kodiert für die viralen Hüllproteine. Die nicht kodierenden, terminalen Regionen folgen bei allen Retroviren dem gleichen Grundschema. Es bestehen jedoch in Größe und Funktion gewisse Unterschiede zwischen den verschiedenen Virusgruppen. Sie spielen eine Rolle bei der Regulation der viralen Genexpression, der reversen Transkription und der Verpackung der Viren (ICTV, 2003).

2.10.3 Virusreplikation

Einige der Oncornaviren kommen in natürlichen Wirten als endogene Viren vor, davon sind viele „ekotrop“, d.h. sie vermehren sich nur im natürlichen Wirt, andere sind „xenotrop“ und vermehren sich nicht in Zellen von Wirten, in welchen sie endogen vorkommen. Schließlich sind „amphotrope“ Virusarten bei den Oncornaviren bekannt, die sich in Zellen von mehr als einer Spezies vermehren, einschließlich der Zellen des natürlichen Wirtes.

Der retrovirale Replikationszyklus zeichnet sich gegenüber dem anderer Viren durch einige Besonderheiten aus: Das RNS-Genom wird zu einem DNS-Äquivalent umgeschrieben und in das Wirtsgenom integriert. Durch die reverse Transkription entsteht, bedingt durch die Duplikation terminaler Sequenzen, ein insgesamt längeres DNS-Genom (ICTV, 2003).

Der erste Schritt der Infektion ist die spezifische Interaktion der SU-Untereinheit des env-Glycoproteins mit dem entsprechenden zellulären Rezeptor. Der Tropismus der Retroviren wird maßgeblich durch diese Interaktion mitbestimmt (ICTV, 2003).

Im zweiten Schritt erfolgt, abhängig von der Art des Virus, der Eintritt in die Zelle entweder durch Endozytose oder Fusion der Virus- und Zellmembran. Bei der Fusion der Membranen spielt die TM-Domäne des env-Proteins eine entscheidende Rolle. Das Ergebnis ist bei beiden Varianten das sogenannte Uncoating (Entfernung der Virusmembran) und die Freisetzung des Nukleokapsids in das Zytoplasma der Wirtszelle (ICTV, 2003).

Die **reverse Transkription** findet im Zytoplasma der Wirtszelle in einem Nukleoprotein-komplex statt und dauert ungefähr vier Stunden. Die reverse Transkription findet im Replikationszyklus der Retroviren nur zu diesem Zeitpunkt, also vor der Integration statt. Sie beginnt unmittelbar nach dem Eindringen und dem Uncoating des Virions. Die virale Polymerase benötigt zur DNS-Synthese Primer, welche in Form von tRNS, die beim vorhergehenden Infektionszyklus in das Virion verpackt wurde, zur Verfügung stehen.

Als Produkt der reversen Transkription entsteht ein lineares, doppelsträngiges DNS-Molekül, welches an beiden Enden duplizierte terminale Sequenzen, die Long Terminal Repeats (LTR)

aufweist. Dieses wird nun im Nukleoproteinkomplex in den Zellkern transportiert um in das Wirtsgenom integriert zu werden.

Die bei Retroviren beobachtete hohe Mutationsrate erklärt sich aus der relativ geringen Genauigkeit der reversen Transkriptase, die keine 3'-5' Exonuklease-Aktivität zur Korrektur von Polymerisationsfehlern besitzt. Eine weitere Fehlerquelle ist die Transkription des Provirus durch zelluläre RNS-Polymerase II, die ebenfalls keine Korrekturlesefunktion besitzt.

Die Integrase vermittelt die **Integration** des Provirus, welche kolinear zum RNS-Genom ist. Die Integration erfolgt an zufälligen Positionen im Wirtsgenom, an Orten mit bestimmter DNS-Struktur scheint eine Integration jedoch wahrscheinlicher (JAENISCH et al., 1976; JAENISCH et al., 1976; WITHERS-WARD et al., 1994). Die Integration des Provirus ist für die Virus-Wirt-Beziehung von großer Bedeutung – die virale Sequenz wird an Tochterzellen weitervererbt und kann durch Integration in die Keimzellen zu einer vertikalen Transmission der Retroviren führen. Die Insertion des Provirus kann durch Wirkung viraler Enhancer eine Aktivierung zellulärer Gene hervorrufen.

Wichtige Eigenschaften der Retroviren, wie zum Beispiel der Zelltropismus und die Pathogenität, werden durch die Regulation der Transkription im integrierten Provirus mitbestimmt. So ist die Expression des viralen Genoms von der Interaktion zellulärer Faktoren mit regulatorischen Sequenzen des Virus abhängig.

Die **Translation** der viralen Proteine findet an den zytoplasmatischen Polysomen statt und wird vom Translationsapparat der Wirtszelle reguliert. Die Synthese der gag- und pol-Genprodukte erfolgt über Vorläuferpolyproteine, die dann durch die viralen und zellulären Proteasen proteolytisch gespalten werden und so in die reife Form überführt werden. Diese gag/pol-Fusionsproteine haben Molekulargewichte zwischen 150 und 200 kD, sie entstehen durch die Verschiebung des ribosomalen Leserasters. Grund der Verschiebung ist die fehlerhafte Erkennung der Codongrenzen durch Ribosomen, was zum Überlesen des Stopcodons der gag-Proteinsynthese führt, und somit die Synthese der pol-Proteine übergeht. Das Translationsprodukt wird im endoplasmatischen Retikulum und im Golgi Komplex durch zelluläre Enzyme modifiziert. Die reverse Transkriptase reift erst im Virion zu einem funktionellen Enzym.

Es gibt zwei grundsätzlich verschiedene Abläufe bei der **Entstehung der Virionen**. Während bei manchen Viren der Aufbau der Virionen über intrazelluläre Vorstufen geht, entstehen andere im Verlauf der Knospung direkt an der Plasmamembran der Wirtszelle.

Der erste Schritt scheint jedoch bei beiden Varianten die Interaktion der NC-Domäne des gag-Polyproteins mit dem Verpackungssignal der viralen RNS zu sein. Die Virionen nehmen die env-Glycoproteine, welche vom Sekretionsapparat der Wirtszelle in die Membran inseriert werden, im Verlauf der Knospung auf. Die entgültige Reifung der elektronendichten Kerne erfolgt durch proteolytische Spaltung der viralen Polyproteine in den frisch freigesetzten Virionen.

2.11 Das Paramyxovirus

2.11.1 Klassifizierung

Die Familie *Paramyxoviridae* wird in zwei Subfamilien, die *Paramyxovirinae* und die *Pneumovirinae* mit sieben Genera eingeteilt (ICTV, 2003).

Subfamilie *Paramyxovirinae*

Rubulavirus

Avulavirus

Respirovirus

Henipavirus

Morbillivirus

Subfamilie *Pneumovirinae*

Pneumovirus

Metapneumovirus

2.11.2 Eigenschaften der Paramyxoviren

2.11.2.1 Morphologie

Paramyxoviren besitzen eine lipidhaltige Hülle und sind von unregelmäßig runder oder filamentöser Morphologie und haben einen Durchmesser von etwa 150 nm bis 350 nm. Die Membran verfügt über verschiedene Oberflächenglykoproteine, dem Hämagglutinin und der Neuraminidase, die für die Adsorption verantwortlich sind, dem Fusionsprotein, einem kleinen hydrophoben Protein, und dem Matrix-Protein (ICTV, 2003). Das Nukleokapsid besteht aus der viralen RNS, dem Nukleoprotein, dem Phosphorprotein und der viralen Polymerase (L-Protein) (ICTV, 2003; MODROW et al., 2003).

2.11.2.2 Nukleinsäure (Genom)

Paramyxoviren besitzen ein nicht-segmentiertes Einzelstrang RNS-Genom (ssRNS) mit negativer Orientierung. Ihre Genome enthalten zwischen 13350 und 18246 Basen. Im Nukleokapsid liegt das Genom als RNS-Nukleoprotein-Komplex vor und ist dadurch vor Bruch oder enzymatischem Abbau geschützt. Typisch für Paramyxoviren befinden sich am 3'-Ende

des Genoms die Leader Sequenz und am 5'-Ende die Trailer Sequenz, die transkribiert, aber nicht translatiert werden und ihre Aufgabe in der Steuerung der Genomreplikation erfüllen. Zwischen jedem Gen ist die virusspezifische Consensussequenz lokalisiert, die eine präzise Transkription steuert. Weiterhin befindet sich innerhalb der P-Genesequenz ein zweiter Leserahmen, der für ein zusätzliches Protein, das Cellular Protein (C), kodiert. Diese open reading frames (ORF) sind bei bisher allen charakterisierten Paramyxovirus-Genomen beschrieben worden und können bis zu drei weitere Proteine kodieren (LAMB et al., 2001; LAMB und KOLAKOVSKY, 2001; ICTV, 2003; MODROW et al., 2003).

2.12 Fragestellung der eigenen Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zur Ätiologie der IBD zu liefern sowie die Häufigkeit von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in Blutzellen bei Boiden sowohl bei in Gefangenschaft gehaltenen Riesenschlangen als auch in der Wildtierpopulation in Costa Rica festzustellen. In erster Linie sollte das Vorkommen bzw. die Beteiligung von Adeno- und Reovirusinfektionen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit aus an IBD erkrankten Tieren isoliert wurden (MARSCHANG et al., 2001), geklärt werden. Auch das Vorkommen von Paramyxo- und Retrovirusinfektionen soll, wegen ähnlicher Krankheitsverläufe, die im Zusammenhang mit IBD beschrieben worden sind, untersucht werden. Insgesamt soll diese Arbeit dazu beitragen, die diagnostischen Nachweismethoden und deren Aussagekraft bei lebenden Tieren zu verbessern.

3 MATERIAL und METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Virusisolate

Die in dieser Arbeit verwendeten Virusisolate (Adenovirus 27/00, Reovirus 26/00, PMV 5688/91) wurden im Institut für Geflügelkrankheiten, dem Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen und im Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim aus IBD-positiven Schlangen (*Boa constrictor*) isoliert, die zur Feststellung der Erkrankungsursache eingesandt wurden. Informationen aus den Vorberichten über Art, Herkunft, Alter und Geschlecht der Schlangen, aus denen die Viren isoliert wurden, finden sich in Tabelle 9.

Tabelle 9: Anamnestische Angaben, Symptome und Ergebnisse der pathologisch-anatomischen Untersuchungen der Schlangen, aus denen die Virusisolate stammen.

Virus, Isoliert aus	Anamnese	Symptome	Weitere Befunde
Adenovirus 27/2000, Leber, Niere, Blut	<i>Boa constrictor</i> (<i>Boa constrictor</i>), juvenil, männl. Gefangenschaftshaltung in Deutschland. Bestand C	ZNS, Diarrhöe, IBD-Verdacht	<i>Salmonella</i> spp. Keine Parasiten
Reovirus 26/2000, Leber	<i>Boa constrictor</i> (<i>Boa constrictor</i>), juvenil, weibl. Gefangenschaftshaltung in Deutschland. Bestand B	ZNS, IBD-Verdacht	<i>Salmonella</i> spp. Keine Parasiten
oPMV, 5688/1991 Lunge	Kornnatter (<i>Pantherophis guttatus</i>) Privathaltung in Deutschland. Todesfälle	Pneumonie	<i>Aeromonas</i> spp. <i>Staphylococcus</i> spp. Keine Parasiten

Die vorläufige Identifizierung der Virusisolate erfolgte aufgrund des typischen cpE in Zellkulturen und des Verhaltens nach Chloroform-Behandlung und bei der Kultivierung in Gegenwart von IUDR sowie aufgrund ihrer elektronenmikroskopisch festgestellten Morphologie und Grösse.

Weitere Angaben zu den verwendeten Virusisolaten enthält die Tabelle 10.

Tabelle 10: Angaben zur Herkunft und Erstbeschreibung der Virusisolate.

Virus	Herkunft	Erstbeschreibung	Erhalten von
Adenovirus 27/00	Abgottschlange <i>Boa constrictor</i> , Deutschland	Marschang (2001)	Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen
Reovirus 26/00	Abgottschlange <i>Boa constrictor</i> , Deutschland	Marschang (2001)	Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen
oPMV 5688/91	Kornnatter (<i>Pantheropsis gutatta</i>) Deutschland	Blahak (1994)	Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen

3.1.2 Verwendete Organ- und Blutplasmaproben

3.1.2.1 Blutproben (Blutausstrich)

Beprobt wurden insgesamt 182 Schlangen. Diese beinhalteten 5 verschiedene Schlangenarten aus 17 Beständen und 5 Ländern (D, I, GB, A, CR).

Eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Blutausstriche von Schlangen findet sich in Tabelle 11 sowie in der Gesamtübersicht in Tabelle 18 im Anhang.

3.1.2.2 Blutplasmaproben

Beprobt wurden insgesamt 153 Schlangen. Diese beinhalteten 5 verschiedene Schlangenarten aus 17 Beständen und 5 Ländern (D, I, GB, A, CR).

Eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Blutplasmaproben von Schlangen findet sich in Tabelle 11 sowie in der Gesamtübersicht in Tabelle 18 im Anhang.

3.1.2.3 Tupferproben (Rachen, Kloake)

Beprobt wurden insgesamt 27 Schlangen. Diese beinhalteten 2 verschiedene Schlangenarten aus Costa Rica (CR).

Eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Tupferproben von Schlangen findet sich in Tabelle 11 sowie in der Gesamtübersicht in Tabelle 18 im Anhang.

3.1.2.4 Organproben (Leber, Niere, Pankreas, Darm)

Beprobt wurde insgesamt 1 Schlange der Art *Boa constrictor* aus Deutschland.

Eine Übersicht der in dieser Arbeit untersuchten Organproben von Schlangen findet sich in Tabelle 11 sowie in der Gesamtübersicht in Tabelle 18 im Anhang.

Tabelle 11: Herkunft und Anzahl der verwendeten Blutplasma-, Tupfer- und Organproben.

Herkunftsland	Anzahl der Proben			
	Blutausstriche	Blutplasma	Tupfer (Rachen, Kloake)	Organe (Leber, Niere, Pankreas, Darm)
D	153	124	0	1
I	1	1	0	0
GB	1	1	0	0
CR	23	23	23	0
A	4	4	0	0
Gesamt	182	153	23	1

3.1.2.5 Negative und positive Kontrollseren

Weil bisher keine Publikationen mit verifizierbaren Spezifitätsgrenzen für VN- und HAH-Teste mit den verwendeten Testviren bekannt sind, können im Rahmen dieser Arbeit lediglich die selbst gemessenen Antikörpergehalte angegeben werden.

3.1.3 Medien und Reagenzien

3.1.3.1 Verwendete Zellkulturen

Es wurden ausschließlich Vipern-Herz-Zellen (VH2) (ATCC, CCL 140; Teddington, Middlesex, UK) verwendet.

3.1.3.2 Medien und Reagenzien für Zellkulturen

Basal Medium Eagle's mit Earleschen Salzen (BME)

100,0 ml/l	BME-Lösung 37,5 g NaHCO ₃ in 500 ml H ₂ O gelöst, von dieser Lösung 146,5 ml in 5000 ml H ₂ O anschließend: 500 ml BME mit L-Glutamin w/o NaHCO ₃ (Seromed, Biochrom KG) dazu. 500 ml abgefüllt
10,0 ml/l	L-Glutamine (Seromed, Biochrom KG)
2,0 ml/l	Streptomycin (Seromed, Biochrom KG)
2,0 ml/l	Penicillin (Seromed, Biochrom KG)
4,0 ml/l	Amphotericin (Seromed, Biochrom KG)

Fetales Kälberserum (FKS)

Mykoplasmen geprüft (Seromed)

Anzucht- und Erhaltungsmedien

VH2-Zellkulturen erhielten im Anzuchtmedium BME mit einem Zusatz von 10 % FKS, im Erhaltungsmedium reichte die Zugabe von 2 % FKS.

Dulbecco´s-Phosphat-Puffer (DPB)

8,00 g/l	(0,1370 M)	NaCl (Merck)
0,40 g/l	(0,0054 M)	KCl (Merck)
1,15 g/l	(0,0072 M)	Na ₂ HPO ₄ (Merck)
0,20 g/l	(0,0015 M)	KH ₂ PO ₄ (Merck)

gelöst in Aqua dest., anschließend autoklaviert und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Trypsin-Stammlösung (10fach)

4,0 g/l		Trypsin 1:250 (Difco)
10,0 g/l	(0,0505 M)	D(+)-Glukose-Monohydrat

gelöst in 10fach konzentriertem DPB, anschließend autoklaviert.

Die Gebrauchslösung besteht aus 1 Teil Stammlösung und 9 Teilen sterilem Aqua dest.

Trypsin-Versen-Lösung

3,5 g/l		Trypsin 1:250 (Difco)
0,2 g/l	(0,0010 M)	Ethylendiamin-tetra-Essigsäure-(EDTA-, Versene)-Na ₂ -Salz (Serva)
1,0 G/l	(0,0051 M)	D(+)-Glukose-Monohydrat
0,5 ml/l	(0,1%ig)	Phenolrotlösung (Merck)

gelöst in Dulbeccos´-s-Phosphatpuffer und mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

3.1.3.3 Medien und Reagenzien für den Hämagglutinationstest

Die Erythrozytensuspensionen stammen von SPF-Hühnern aus dem Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Physiologische Kochsalzlösung

8,5 g/l NaCl (Merck)

gelöst in 1000 ml Aqua dest.

1 %ige Erythrozytensuspension

10 ml/l	(1 %ig)	Erythrozytensuspension mit NaCl-Lösung verdünnt (Institut für Geflügelkrankheiten der Justus-Liebig-Universität Gießen)
---------	---------	--

3.1.3.4 Reagenzien für Antiserumherstellung und antigenetische Untersuchungen**Trispuffer (0,1 M)**

12,114 g/l	(0,1 M)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Merck)
------------	---------	--

gelöst in Aqua dest., autoklaviert und mit 1N HCl auf pH 7,6 eingestellt.

Elutionspuffer

85,0 g/l	(1,4557 M)	NaCl (Merck)
12,114 g/l	(0,1 M)	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

gelöst in Aqua dest., autoklaviert und mit 1N HCl auf pH 7,6 eingestellt.

Polyethylenglykol (PEG) – Stammlösung

500 g/l	Polyethylenglykol 6000 (Merck)
---------	--------------------------------

Gelöst in 0,1 M Trispuffer und mit 1 N HCl auf pH 7,6 eingestellt.

Phosphate Buffered Saline (PBS)

10fach konzentrierter Ansatz:

100,0 g/l	(1,7126 M)	NaCl (Merck)
2,5 g/l	(0,0338 M)	KCl (Merck)
2,5 g/l	(0,0186 M)	KH ₂ PO ₄ (Merck)
6,0 g/l	(0,0376 M)	Na ₂ HPO ₄ (Merck)

gelöst in Aqua dest.

Ethidiumbromidlösung

1 µg/ml in Aqua bidest.

Freund'sches Adjuvans

Freund's Adjuvant inkompletz oder komplett (SIGMA).

3.1.3.5 Medien und Reagenzien für Probenmaterial

Transportmedium

100,0 ml/l	BME-Lösung:
	37,5 g NaHCO ₃ in 500 ml H ₂ O gelöst, von dieser Lösung 146,5 ml in 5000 ml H ₂ O anschließend: 500 ml BME-Earle mit L-Glutamine w/o NaHCO ₃ (Seromed, Biochrom KG) dazu.
	sterilfiltriert á 500 ml abgefüllt
10,0 ml/l	L-Glutamine (Seromed, Biochrom KG)
4,0 ml/l	Streptomycin (Seromed, Biochrom KG)
4,0 ml/l	Penicillin (Seromed, Biochrom KG)
8,0 ml/l	Amphotericin B (Seromed, Biochrom KG)

Gerinnungshemmer (Natrium-Citrat)

0,5 ml	(0,106 M)	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ ·2H ₂ O (Sarstedt)
--------	-----------	--

Die Monovetten von Sarstedt enthalten 0,5 ml Natrium-Citrat.

3.1.3.6 Reagenzien für die Färbung von Blutaussstrichen

Färbung nach Pappenheim

MAY-GRÜNWARD-Lösung, enthält eosinsaures Methylenblau in Methanol in Glycerin im Verhältnis 2:1 (Merck)

Giemsa-Stammlösung, enthält Azur-Eosin-Methylenblaulösung in Glycerin im Verhältnis 1:1 (Merck)

GIEMSA-Gebrauchslösung (1/2 Stunde verwendbar) aus 1 Volumenanteil GIEMSA-Stammlösung mit 20 Volumenanteilen neutrales Aqua bidest.

Aqua bidest., neutral gepuffert mit Puffertabletten (pH 7,2) nach Weise (Merck)

Färbung mit Diff-Quick

Diff-Quik-Set, Heiland.

3.1.3.7 Medien und Reagenzien für die Gelelektrophorese**Probenpuffer (einfach)**

0,3 g	Dithiothreitol 4 ml 10 % SDS (G)
1,6 ml	Spacer-Puffer/Sammelgelpuffer (C)
2,5 ml	Glycerin 99,5 % (Roth)
0,5	Bromphenolblau Na-Salz (Roth)

Mit Aqua dest. auf 20 ml auffüllen, für zweifach-Puffer mit 10 ml auffüllen.

Marker

peq Gold Protein Marker (Prestained), peqLab.

Sammelgel 5 % (für 2 Gele)

0,9 ml	Acrylamid PAGE 40 % (plusone)
0,9 ml	N, N'-Methylenbisacrylamid 2 % (plusone)
1,25 ml	Spacer-Puffer (C)
6,8 ml	Aqua bidest.
0,1 ml	SDS 10 % (G)
7,5 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 99 % (Roth)
75 µl	Ammoniumpersulfat 10% (APS, 3,3 mg/ml) (plusone)

Trenngel 7,5 % (für 2 Gele, 15 ml)

2,80 ml	Acrylamid PAGE 40 % (plusone)
2,90 ml	N, N'-Methylenbisacrylamid 2% (plusone)
3,75 ml	Resolving-Puffer (B)
1,50 ml	Glycerin 99,5 % (Roth)
3,90 ml	Aqua bidest.
0,15 ml	SDS 10 % (G)
6,60 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 99 % (Roth)
66,00 µl	Ammoniumpersulfat 10 % (APS, 3,3 mg/ml) (plusone)

Trenngel 10 % (für 2 Gele, 10ml)

2,50 ml	Acrylamid PAGE 40% (plusone)
2,66 ml	N, N'-Methylenbisacrylamid 2% (plusone)
2,50 ml	Resolving-Puffer (B)
1,00 ml	Glycerin 99,5% (Roth)
1,20 ml	Aqua bidest.
0,10 ml	SDS 10 % (G)

6,6 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 99 % (Roth)
66 µl	Ammoniumpersulfat 10 % (APS, 3,3 mg/ml) (plusone)

Trenngel 15 % (für 2 Gele, 15 ml)

5,44 ml	Acrylamid PAGE 40 % (plusone)
3,99 ml	N, N'-Methylenbisacrylamid 2 % (plusone)
3,75 ml	Resolving-Puffer (B)
1,50 ml	Glycerin 99,5 % (Roth)
0,06 ml	Aqua bidest.
0,15 ml	SDS 10 % (G)
9,9 µl	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) 99 % (Roth)
99 µl	Ammoniumpersulfat 10 % (APS, 3,3 mg/ml) (plusone)

Resolving-Puffer/Trenngelpuffer 1,5 mol/l (B)

18,2 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9 % (Roth) in 80 ml Aqua dest. lösen und mit 4 M HCL auf pH 8,8 einstellen
--------	---

Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen, kühl lagern.

Spacer-Puffer / Sammelgelpuffer 1,0 mol/l (C)

12,1 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9 % (Roth) in 70 ml Aqua dest. lösen und mit 4 M HCl auf pH 6,8 einstellen
--------	---

Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen, kühl lagern.

Natriumdodecylsulfat, 10 % SDS (G)

10,0 g	SDS 99 % ultra pure (Roth)
--------	----------------------------

Mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen, bei Raumtemperatur lagern.

Ammoniumpersulfat, 10 % APS

1,0 g	Ammoniumpersulfat 99 % (plusone)
-------	----------------------------------

Mit Aqua dest. auf 10 ml auffüllen, gefroren lagern.

Butanol

1-Butanol 99 % (Roth)

Elektrophoresen-Laufpuffer

30 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9 % (Roth)
144 g	Glycin 99,9 % (Roth)
	In 800 ml Aqua dest. lösen

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Fixierlösung

400 ml	Ethanol 99,8 % (Roth)
100 ml	Essigsäure (Eisessig) 99,7 % (Roth)

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Färbelösung

1 Tab.	PhastGel Blue R (Pharmacia Biotech)
400 ml	Entfärber

Auf 60 °C erhitzen.

Entfärber

300 ml	Ethanol 99,8 % (Roth)
80 ml	Essigsäure (Eisessig) 99,7 % (Roth)

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

3.1.3.8 Medien und Reagenzien für den Westernblot**Methanol**

Methanol 99,8 % (Roth).

Transferpuffer

2,9 g	Glycin 99,9 % (Roth)
5,8 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9 % (Roth)
0,37 g	SDS 99 % ultra pure (Roth)
200 ml	Methanol 99,8 % (Roth)

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

TBS

10 ml	Trispuffer 1M auf pH 7,4 eingestellt
37,5 ml	NaCl 4M

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Blocking stock

60 ml	TBS Tween-Puffer
0,6 g	Albumin aus Rinderserum BSA (Serva)

Blocking-Puffer

3 ml	blocking stock
17 ml	TBS

TBS-Tween-Puffer

500 µl	Tween 20 (Merck)
20 ml	Trispuffer 1M auf pH 7,4 eingestellt
125 ml	NaCl 4M

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

Trispuffer (1 M)

121,14 g/l (1 M) Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9% (Roth)
gelöst in Aqua dest. und mit 1N HCl auf pH 7,4 eingestellt.

Antikörper

Goat Anti-rabbit IgG mit Peroxidase konjugiert, (H&L).

Citrat-Phosphat-Puffer

7,3 g	Citronensäure
23,9 g	Na ₂ HPO ₄

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, mit 1N HCl auf pH 5,0 einstellen und kühl lagern.

Aminoethylcarbazol-Lösung (AEC)

10 mg	Aminoethylcarbazol
-------	--------------------

In 1 ml Ethanol gelöst.

Aminoethylcarbazol-Färbung

10 ml	Citrat-Phosphat-Puffer
200 µl	AEC
10 µl	Wasserstoffperoxid, H ₂ O ₂ 30 % (Merck)

3.1.3.9 Medien und Reagenzien für die PCR

PCR-Puffer (10fach)

50 mM	KCl
10 mM	Tris HCl

Primer (nach TRISTEM et al., 1995)

119,2 nmol	Retro 1 (Thermo Hybaid) 5'-GT(T/G) TTI (G/T)TI GA(T/C) ACI GGI (G/T)C-3'
109,1 nmol	Retro 2 (Thermo Hybaid) 5'-ATI AGI A(G/T)(G/A) TC(A/G) TCI AC(A/G) T-3'

Mit Aqua bidest. auf 100 pmol/μl eingestellt, und in 50 μl Portionen aufgeteilt.

Mastermix für 50 μl (Prämix)

Volumen	Reagenz	Endkonzentration
32,6 μl	Aqua bidest.	
5 μl	PCR-Puffer 10fach (-MgCl ₂)	1fach
5 μl	dNTP's (2 mM)	je 200 μM
1,5 μl	Primer Retro1 (100μM)	150 pmol
1,5 μl	Primer Retro2 (100 μM)	150 pmol
3 μl	MgCl ₂ (25 mM)	1,5 mM
0,4 μl	<i>Taq</i> Polymerase (5U/μl)	2 U

In 49 μl Ansätze trennen, mit 60 μl Mineralöl überschichten und je 1,0 μl Probe dazu.

3.1.3.10 Medien und Reagenzien für die Flachbeet-Agarosegelelektrophorese

0,5 M EDTA (pH 8)

46,53 g	Ethylendiamintetraessigsäure (Roth) in 200 ml Aqua dest. lösen und mit NaOH auf pH 8,0 einstellen
---------	--

Mit Aqua dest. auf 250 ml auffüllen.

TAE-Puffer (50fach)

242,0 g	Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9 % (Roth)
57,1 ml	Essigsäure (Eisessig) 99,7 % (Roth)
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8.0)

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.

TAE-Puffer (1fach)

40 ml TAE-Puffer (50fach)

Mit Aqua dest. auf 2000 ml auffüllen.

Ethidiumbromid (10 mg/ml)

100 mg Ethidiumbromid (Merck)
in 10 ml Aqua dest. lösen

Agarosegel (1,5 %)

100 ml TAE-Puffer (1fach)
1,5 g Agarose NEEO (Roth)
5,0 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)

Aufkochen lassen.

Laufpuffer (Beladungspuffer)

5 % Vol Brillant Blau R 250 (Roth)
75 % Vol Saccharose in Aqua bidest. gelöst

Marker

1 µg/µl 100 bp DNS Ladder (Invitrogen)

Positivkontrolle (Retrovirus-DNS)

50 ng/µl FI 74 (Gießen)

3.1.3.11 Medien und Reagenzien für den ELISA (Enzym-Linked Immunosorbent Assay)**Protein A-Agarose**

Protein A-Agarose, Recombinant, Expresse (SIGMA).

Trispuffer (1 M)

121,14 g/l (1 M) Tris(hydroxymethyl)aminomethan 99,9 % (Roth)
gelöst in Aqua dest. und mit 1N HCl auf pH 8 eingestellt.

Trispuffer (0,1 M)

100 ml Trispuffer 1 M
auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und mit 1N HCl auf pH 8 eingestellt.

Trispuffer (0,01 M)

100 ml Trispuffer 0,1 M

auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und mit 1N HCl auf pH 8 eingestellt.

Glycin (1 M) Stammlösung

7,507 g Glycin 99,9 % (Roth)

auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt und mit 1N HCl auf pH 3 eingestellt.

Glycin (0,1 M)

10 ml Glycin (1 M)

auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt.

Coating Buffer (0,1 M Na-Carbonat)

8,4 g Natriumhydrogencarbonat, NaHCO₃ (Merck)

3,56 g Natriumcarbonat, Na₂CO₃ (Merck)

auf 1000 ml mit Aqua dest. aufgefüllt, und mit NaOH auf pH 9,5 eingestellt. Immer frisch hergestellt, hält ca. 1 Woche bei 4 °C.

Washing Buffer (Tween-PBS)

0,5 ml Tween 20 (Merck)

1000 ml PBS

Blocking Buffer (PBS mit 10 % FKS)

50 ml FKS

450 ml PBS

Substrate Solution (ABTS)

1 Tab. ABTS (Roche)

in ABTS-Puffer gelöst, gemäß Hersteller

3.1.4 Weitere Materialien

Laborartikel

DNeasy Tissue Kit 250 (Cat. No. 69506, Qiagen)
Einmalkanülen (20 G x 1 ½; 0,9 x 40 mm, TERUMO)
EZ-LinkTMPlus Activated Peroxidase und Kit (Pierce)
Gel-blotting-Papier (300 x 600 mm GB 002, Schleicher & Schuell)
Gewebekulturschalen (TC, 35,0/10 mm, steril, mit Nocken, GREINER)
Gewebekulturflaschen (50 ml/25 cm², steril, mit Filter, GREINER)
Gewebekulturflaschen (270 ml/75cm², steril, mit Filter, GREINER)
Gewebekulturflaschen (550 ml/182cm², steril, mit Filter, GREINER)
Nunc-ImmunoTMPlatten (F96 MaxiSorp, Nunc)
Monovetten (92 x 11,5 mm; 0,5 ml Citrat, Sarstedt)
Transfermembran (BioTraceTMPVDF Polyvinylidene Fluoride 0,45 µm, Pall Corporation)
Reaktionsgefäße (Safe-Look Tubes 2 ml, Eppendorf)
Reaktionsgefäße (Reaktionsgefäße 3810X 1,5 ml, Eppendorf)
Reaktionsgefäße (1,5 ml, DNS-, DNase-, RNase- und Pyrogenfrei, Biozym)
Reaktionsgefäße (ThermoTubeTMPCR Tubes 0,5 ml, peqlab)
Zentrifugenröhrchen (PP-Röhrchen, steril, 15 ml, 17,0/120 mm, GREINER)
Zentrifugenröhrchen (PP-Röhrchen, steril, 50 ml, 30,0/115 mm, GREINER)
96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten + Deckel für Gewebekulturen, Falcon (Becton Dickinson)
96-Well-Rundboden-Mikrotiterplatten + Deckel für Gewebekulturen, Falcon (Becton Dickinson)

Geräte

Brutschrank für Zellkulturen (CO₂-Auto-Zero, Heräus und Fa. Binder)
Chromatograph, FPLC (ÄKTA prime, Amersham Pharmacia Biotech)
Computerprogramm (Ascent)
Computerprogramm (BioCaptMW Version 99.03s für Windows)
Drucker (REC 112, amersham pharmacia biotech)
Dual Gel Caster (Mighty Small SE 245, Hoefer)
Feinwaage (PC 440, Mettler)
Gefrierbox (ALDI)
Horizontale Elektrophoresekammer (Agagal Mini, Biometra)
Horizontale Elektrophoresekammer (MWG-Biotech)
Inversmikroskop (Wilovert, WILL Wetzlar)
Magnetrührer (Combimag RCT, IKA)
Mikroskop (Dialux 20 EB, Leitz, Wetzlar)

pH-Meter (Microprocessor pH Meter pH 539, WTW)
Rotor für Ultrazentrifuge (45 Ti-Rotor, Beckman)
Rüttler (WT 12, Biometra)
Steuergerät (CHEF-DR III System, BIO-RAD)
Spannungsgeber (Electrophoresis Power Supply Modell 3000 Xi, BIO-RAD)
Spannungsgeber (Biometra)
Spannungsgeber (E443, Consort)
Thermoblock (TRIO-Thermoblock, Biometra)
Thermoblock (TB1 Thermoblock, Biometra)
Thermocycler (TouchDown, Hybaid)
Photometer (Micronaut Skan 352, Labsystems)
Ultraschall (Sonifier 250, Branson Ultrasonics)
Ultraschallbad (Sonorex RK 510, BANDELIN)
Ultrazentrifuge (L7, Beckman)
Vertikale Elektrophoresekammer (Mighty Small II SE 250, Hoefer)
Videoprinter (Video Copy Processor, Mitsubishi)
Wasserbad (Thermo V26, Haake)
Wasserpumpe (Modell 1000 Mini Chiller, BIO-RAD)
Werkbank (HERA safe, Heraeus)
Western-Blot (Fastblot B 44, Biometra)
Zentrifuge (Biofuge 15, Heraeus)
Zentrifuge (GR 421, Jouan)
Zentrifuge (Centrifuge 5415 D, Eppendorf)

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung der Proben

3.2.1.1 Blutproben

Blutentnahme

Die Blutentnahme wurde nach SAMOUR et al. (1984) und ZWART (1995) durch blinde Punktion der ventralen Schwanzvene (Vena coccygea ventralis) durchgeführt. Dazu wurden die Schlangen hängend von einem oder mehreren Helfern fixiert. Die eine Hand hielt das Tier am Kopf, die andere unterstützt das Tier am Körper. Zur Blutentnahme wurden Kanülenlumina unabhängig von der Größe des Tieres von 0,9 mm Durchmesser (Einmalkanülen, 20 G x 1 ½; 0,9 x 40 mm, TERUMO) mit nicht aufgesetzter Spritze verwendet. Unmittelbar vor dem Einstich wurden die Kanülen mit Na-Citrat gespült. Eingestochen wurde zwischen zwei Schuppen exakt in der Medianen im Bereich des kranialen Drittels der ventralen Schwanzseite.

Unter Schonung der Hemipenistaschen der männlichen und der Analdrüsen der weiblichen Tiere, wurde die Injektionsnadel in einem Einstechwinkel von ca. 30-45 ° nach craniodorsal in Richtung der Wirbelkörper vorgeschoben. Beim Vorschieben war kurz vor dem Wirbelkörper damit zu rechnen, dass sich der Konus mit Blut füllte, in diesem Fall wurde die Monovette (92 x 11,5 mm; 0,5 ml Citrat, Sarstedt) aufgesetzt und gefüllt. Hatte man den Wirbelkörper erreicht ohne dass Blut in den Konus einströmte, so wurde die Kanüle in dieser Position belassen, da sich die Venenklappen bei Punktion reflektorisch schließen, erst anschließend wurde versucht, die Lage der Kanüle gering zu verändern, bis schließlich Blut einströmte. Es wurde nach Möglichkeit wenigstens 1 ml Blut entnommen, höchstens jedoch 0,6 ml/100 g KGW. Die so gewonnenen Proben wurden bis zur Aufbereitung kühl gelagert.

Bild 1: Blutprobenentnahme



Gewinnung von Blutplasma- und Blutzellen

Zur Gewinnung von Blutplasma aus Citratblut kam eine Zentrifuge (GR 421, Jouan) zum Einsatz. Die Zentrifugierzeit betrug 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute.

Das Blutplasma aus Schlangen von Costa Rica wurde in ein flüssigkeitsdichtes Transportgefäß (Reaktionsgefäße, Safe-Look Tubes 2 ml, Eppendorf) verbracht und in Costa Rica bei ca. minus 18 °C tiefgefroren.

Die Blutzellen wurden in ein mit ca. 3 ml Transportmedium gefülltes flüssigkeitsdichtes Zentrifugenröhrchen (PP-Röhrchen, steril, 15 ml, 17,0/120 mm, GREINER) verbracht und die in Costa Rica gewonnenen Proben bei ca. minus 18 °C tiefgefroren. Auf dem Weg nach Deutschland wurden die Proben in einer Gefrierbox (ALDI) mit Eis gekühlt transportiert. Die Proben aus Deutschland wurden bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C tiefgefroren bzw. frisch verwendet.

3.2.1.2 Tupfer

Von jedem Untersuchungstier in Costa Rica wurden ein Kloaken- und ein Rachenabstrich gewonnen. Es wurde der Tupfer mit leichtem Druck an der Schleimhaut entlanggerollt, um sicherzustellen, dass sich genügend Zellmaterial auf dem Tupfer befand. Die Tupfer wurden in ein, mit ca. 3 ml Transportmedium gefülltes, flüssigkeitsdichtes Zentrifugenröhrchen (PP-Röhrchen, steril, 15 ml, 17,0/120 mm, GREINER) verbracht und in Costa Rica bei minus 18 °C tiefgefroren. Auf dem Weg nach Deutschland wurden die Proben in einer Gefrierbox (ALDI) mit

Eis gekühlt transportiert. Die Proben aus Deutschland wurden bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C tiefgefroren bzw. frisch verwendet.

3.2.1.3 Aufbereitung der Tupferproben

Die Aufbereitung der Tupferproben wurde in Deutschland im Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim und im Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgenommen.

Die Blutzellen, Kloaken- und Rachentupfer aus Costa Rica wurden aufgetaut, die Proben aus Deutschland i.d.R. frisch verwendet und jeweils in ein Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Transportmedium gegeben. Mittels Ultraschallbehandlung (Sonifier 250, Branson Ultrasonics) wurden die Zellen aufgeschlossen, um eine vermehrte intrazelluläre Viruspartikelfreisetzung zu bewirken (BIERMANN, 1995). Der Überstand wurde zur Inokulation der Zellkulturen verwendet.

Das tiefgefrorene Blutplasma aus Costa Rica wurde aufgetaut, die Proben aus Deutschland frisch bearbeitet. Eine Verdünnung war in den meisten Fällen nicht notwendig, in den Fällen wo nur sehr geringe Plasmavolumina vorhanden waren wurde mit PBS verdünnt. Es wurde anschließend jeweils 100 µl für 30 Minuten auf 56 °C erhitzt, um unspezifische Inhibitoren zu inaktivieren.

Die Aufbewahrung der Proben bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei minus 18 °C.

3.2.2 Blutausstriche

Es wurden pro Schlange i.d.R. drei Blutausstriche angefertigt. Dazu wurde ein kleiner Blutropfen, ca. 10 µl, am äußeren Rand eines entfetteten, staubfreien Objektträgers blasenfrei aufgesetzt und der Objektträger mit Daumen und Zeigefinger der einen Hand an der gegenüberliegenden Schmalseite fixiert. Mit dem Zeigefinger und Daumen der anderen Hand wurde ein plan geschliffenes Deckgläschen im spitzen Winkel von links an den Blutropfen herangeführt, bis sich der Blutropfen gleichmäßig an der Kante des Deckgläschens ausgebreitet hatte. Das Blut wurde daraufhin zügig mit dem Deckglas in einem Winkel von ca. 45 ° über den Objektträger ausgestrichen. Alle Ausstriche wurden luftgetrocknet.

3.2.2.1 Färbung der Blutausstriche

Die luftgetrockneten Ausstriche wurden mit der Färbung nach Pappenheim oder mit dem Diff-Quik-Set (Baxter) gefärbt. Ein zweiter Ausstrich wurde mit der HE-Färbung gefärbt.

Pappenheim-Färbung

Die Ausstriche wurden auf eine Färbebank mit May-Grünwald-Lösung beetartig bedeckt und etwa drei Minuten mit dieser Lösung fixiert. Nach der Fixierung wurde etwa die gleiche Menge an neutralem Aqua bidest. zugesetzt, so dass der Flüssigkeitsüberschuss abfloss. Nach einer Minute wurde die gesamte Flüssigkeit abgeblasen. Es wurde sodann ca. 6 ml verdünnte Giemsa-Gebrauchslösung aufgetropft bis die Objektträger beetartig bedeckt waren und etwa 20 Minuten mit dieser Lösung gefärbt. Schließlich wurde die Flüssigkeit vollständig abgekippt und mit neutralem Wasser gespült. Die gefärbten Präparate wurden luftgetrocknet und die Rückseite mit Alkohol von Farbresten befreit.

Färbung mit dem Diff-Quik-Set

Einige Blutausstriche wurden mit dem gebrauchsfertigen Färbeset Diff-Quik zum Färben von Differentialblutbildern gemäß der Anleitung des Herstellers gefärbt.

HE-Färbung

Die HE-Färbung wurde mit einer Färbemaschine am Institut für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig Universität Gießen durchgeführt. Sämtliche Ausstriche wurden zur Konservierung zusätzlich mit einem Deckgläschen und Schnelleinschlussmittel (Eukitt, Riedel de Haen, Seelze /Hannover) konserviert.

3.2.2.2 Untersuchung und Beurteilung der Blutausstriche

Die Untersuchung und Beurteilung der mit Pappenheim bzw. Diff-Quik und HE gefärbten Ausstriche auf charakteristische intrazytoplasmatische erythrozytäre Einschlusskörperchen wurde mit 100er Ölimersion unter dem Mikroskop (Dialux 20 EB, Leitz) meanderförmig durchgeführt.

Pappenheim-Färbung

Als charakteristische intrazytoplasmatische erythrozytäre Einschlusskörperchen wurden Einschlüsse mit einer Größe von ca. 1 – 4 µm und von bläulichblauer (basophiler) Anfärbung angesprochen.

Färbung mit dem Diff-Quik-Set

Analog zur Pappenheim-Färbung.

HE-Färbung

Als charakteristische intrazytoplasmatische erythrozytäre Einschlusskörperchen wurden Einschlüsse mit einer Größe von ca. 1 – 4 µm und von eosinophiler Anfärbung angesprochen.

3.2.2.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Blutausstriche

Die Ausstriche wurden kurz nach der HE-Färbung fluoreszenzmikroskopisch im Wellenlängenbereich von 520 nm und 590 nm (Zeiss-Filterset 09 und 15, ZEISS) auf charakteristische fluoreszierende intrazytoplasmatische erythrozytäre Einschlusskörperchen untersucht und beurteilt (HETZEL, U., mündl. Mitt.).

3.2.3 Zellkulturen

3.2.3.1 Primäre Zellkulturen

Die Herstellung von primären Zellkulturen wurde nach SCHAT und PURCHASE (1989) durchgeführt. Aus Lebern und Nieren von IBD-positiven Schlangen (*Boa constrictor*) wurden Proben entnommen und mehrmals in DPB gewaschen. Anschließend wurden die Proben in einer leeren Petrischale mittels Schere homogenisiert. Das Homogenat wurde dann in einen Erlenmeyerkolben mit DPB verbracht und für 10 Minuten auf einem Magnetrührer (Combimag RCT, IKA) gerührt. Anschließend blieb der Erlenmeyer-Kolben für 10 Minuten schräg stehen und der Überstand wurde verworfen. Dieser Vorgang wurde solange wiederholt, bis der Überstand klar blieb (ca. 2-3 Mal).

Zu dem so gewonnenen Sediment wurde Trypsin-Lösung gegeben und für 30 Sekunden gerührt, anschließend wurde der Kolben für 10 Minuten schräg stehen gelassen und der Überstand verworfen. Dem Sediment wurde wieder Trypsin-Lösung zugegeben, 10 Minuten gerührt und 10 Minuten schräg stehen gelassen. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und die so gewonnenen Überstände in ein Zentrifugenglas mit einem ml FKS verbracht. Die Zellsuspension wurde bei 1000 rpm für 10 Sekunden zentrifugiert. Das so gewonnene Pellet wurde anschließend mit BME unter Zusatz von 10 % FKS resuspendiert und auf Zellkulturschalen (TC, 35,0/10 mm, steril, mit Nocken, GREINER) verteilt. Die Zelldichte wurde unter dem Mikroskop geprüft, beurteilt und auf ca. eine Million Zellen pro ml eingestellt.

3.2.3.2 Subkulturen (permanente Zelllinie VH2)

Zur Gewinnung von Subkulturen wurden die Zellkulturen nach Abgießen des Erhaltungsmediums mit Trypsin-Versen-Lösung einmal gewaschen, danach mit einer Trypsin-Versen-Lösung überschichtet und im Brutschrank bei 28 °C mit 5 % CO₂ Gehalt für 10 Minuten inkubiert, oder bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis zum Abkugeln und Lösen der Zellen. Die abgelösten Zellen wurden in BME mit Zusatz von 10 % FKS resuspendiert und auf Zellkulturschalen (TC, 35,0/10 mm, steril, mit Nocken, GREINER) verteilt. Das

Verdünnungsverhältnis betrug 1:2 bei VH2-Zellen. Zur weiteren Bebrütung wurden die Kulturgefäße im Brutschrank für Zellkulturen (Binder) bei 28 °C mit 5 % CO₂ Gehalt aufbewahrt.

3.2.3.3 Technik der Zellkulturbeimpfung

Für die Virusisolierung wurden drei verschiedene Techniken verwendet:

a) Beimpfung eines ausgewachsenen Monolayers

Das Medium über einer ausgewachsenen, einen Tag alten Zellkultur wurde abgesaugt und verworfen. Nach Aufbringen des Virusinokulates, bzw. der aufbereiteten Proben wurde der beimpfte Zellrasen für eine Stunde bei 28 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Erhaltungsmedium zugefügt.

b) Gleichzeitige Einsaat von Virus- und Zellsuspension

Frisch subkultivierte Zellen wurden in Anzuchtmedien suspendiert in Gewebekulturflaschen gegeben, in die das Inokulum zur Virusisolierung bzw. -vermehrung schon vorgelegt war.

c) Gleichzeitige Einsaat von primärer- und permanenter Zellsuspension (co-Inkubation)

Frische Subkulturen wurden in ihren Anzuchtmedien nach ihrer Herstellung in Zellkulturflaschen gegeben, in denen die Zellsuspension (primäre Zellkulturen aus Leber bzw. Nierenzellen) schon vorgelegt war.

Je nach Zellkulturgefäß wurden unterschiedliche Volumina Anzucht- oder Erhaltungsmedium und Virussuspension bei der Beimpfung benutzt. Bei den verschiedenen Beimpfungstechniken gab es bezüglich der verwendeten Volumina keine Unterschiede.

Für 8,7 cm²-Zellkulturschälchen (steril, GREINER), 25 cm²-Zellkulturflaschen, 75 cm²- und 182 cm²-Gewebekulturflaschen (steril, mit Filter, GREINER) genügte die Zugabe von 0,2 ml, 0,5 ml, 1,0 ml bzw. 2,0 ml Virussuspension des jeweiligen Virusstammes. Dazu wurde 1,8 ml, 5 ml, 24 ml bzw. 98 ml Anzucht- oder Erhaltungsmedium hinzugefügt. Zur weiteren Bebrütung wurden die Kulturgefäße im Brutschrank für Zellkulturen (Binder) bei 28 °C mit 5 % CO₂ Gehalt aufbewahrt.

3.2.3.4 Passagierung

Die Zellkulturen, die mit dem aufbereiteten Probenmaterial inokuliert waren, wurden alle zwei Tage mittels Inversmikroskop (Wilovert, WILL, Wetzlar) auf zytopathische Veränderungen untersucht. Nach drei Wochen Bebrütung wurde der Monolayer mittels einer sterilen Pipettenspitze vom Untergrund abgeschabt und erneut eine frische Subkultur mit 0,2 ml der so

gewonnenen Suspension beimpft. Die Zellkulturschälchen (steril, GREINER) wurden im Brutschrank für Zellkulturen (Binder) bei 28 °C mit 5 % CO₂ Gehalt erneut inkubiert.

Insgesamt wurden auf diese Weise drei Passagen mit den jeweiligen Proben durchgeführt.

3.2.3.5 Virusernte

Die Zellkulturen, die mit den Virusisolaten Reo 26/00, Adeno 27/00 und PMV 5688/91 inokuliert waren, wurden täglich mittels Inversmikroskop (Wilovert, WILL Wetzlar) auf zytopathische Veränderungen untersucht. Nach Auftreten eines ausgeprägten cpE wurde der Zellkulturüberstand gewonnen und durch zehnmütiges Zentrifugieren (GR 421, Jouan) bei ca. 3000 U/min geklärt und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C aufbewahrt.

3.2.4 Hämagglutinationstest

Die Fähigkeit zur Hämagglutination der Reovirusisolate wurde mit virushaltigem Zellkulturüberstand mit 1 %iger Erythrozytensuspension von SPF-Hühnern in physiologischer Kochsalzlösung überprüft. Dazu wurde in 96-Well-Rundboden-Mikrotiterplatten (Becton Dickinson) die jeweilige Virussuspension in log₂-Schritten in physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Nach Zugabe gleichen Volumens (50 µl) einer Erythrozytensuspension wurde die Platte bei Zimmertemperatur 30 Minuten inkubiert (BEARD, 1989). Das Ablesen des Tests erfolgte danach bei schräggestellter Platte. Als positives Kontrollvirus diente das Paramyxovirus-Isolat 5688/91. Als negative Kontrolle diente das gleiche Volumen (50 µl) physiologische Kochsalzlösung. Als positive Hämagglutination wurde eine auf dem Boden der Wells haftende dünne Lage miteinander vernetzter Erythrozyten gewertet. Ein negatives Hämagglutinationsergebnis lag vor, wenn sich die Erythrozyten am Boden der Wells unter Bildung eines „Knopfs“ angesammelt hatten, wobei nach Schrägstellung der Platte dieser Knopf tropfen- oder tränenähnlich zur tieferen Seite der Platte auslief.

3.2.5 Virustitration

Die virushaltigen Suspensionen wurden in Reagenzgläsern in log₁₀-Schritten von 10⁻¹ bis 10⁻¹⁰ in BME verdünnt. In einer 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatte (Becton Dickinson) erfolgte nach Vorlage von 25 µl BME in jedes Loch die Zugabe von 25 µl jeder Verdünnungsstufe des Virus im achtfachen Ansatz. Die so vorbereiteten Platten wurden mit 50 µl einer VH2-Zellsuspension in jeder Vertiefung versehen. Als Zellkontrollen wurden zwei Reihen mit 50 µl BME und 50 µl VH2-Zellsuspension mitgeführt. Nach 5 Tagen bei 28 °C im Brutschrank erfolgte die mikroskopische Ermittlung des cpE. Die Berechnung des Virusgehaltes in KID₅₀ erfolgte nach SPEARMAN und KAERBER (zitiert nach MAYR et al., 1989).

3.2.6 Virus-Neutralisations-(VN)-Test

3.2.6.1 Konzentrierung und Reinigung des Virus

Virusanreicherung durch Fällung mit Polyethylenglykol, modifiziert nach LANCZ (1973)

Durch diese Fällung wird eine bis zu sechzigfache Viruskonzentration bei gleichzeitiger Reinigung von 80-90 % der nicht-viralen Begleitproteine erreicht. 88 ml virushaltigen Zellkulturüberstandes des Virusisolates (Isolat Reovirus 26/00), Überstand Ü1, wurde mit PEG im Verhältnis 4:1 vermischt und bei + 4 °C mindestens zwölf Stunden verrührt. Nach 20minütiger Zentrifugation (GR 412, Jouan) bei 3000 U/min wurde der so erhaltene Überstand Ü2 verworfen, die Viruspartikel waren im Sediment ausgefällt. Das Sediment wurde mit 6 ml Elutionspuffer durch 20minütiges Rütteln resuspendiert, durch erneutes Zentrifugieren wurde ein neues Sediment erhalten, der Überstand Ü3 wurde aufbewahrt. Noch zweimal wurde der Vorgang von Resuspension und Zentrifugation mit jeweils 6 ml frischem Elutionspuffer wiederholt. Von den beiden letzten Überständen (Ü4 und Ü5) wurde jeweils 1,6 ml gemischt. Das Gemisch wurde dann wieder zentrifugiert und Überstand Ü6 gewonnen. Von jedem Überstand wurde eine Titerbestimmung vorgenommen.

Konzentrierung und Reinigung des Virus durch Ultrazentrifugation

80-160 ml virushaltiger Zellkulturüberstand (aus Zellkulturbeimpfung mit Isolat Reovirus 26/00) wurde zunächst durch halbstündiges niedertouriges Zentrifugieren bei 3000 U/min vorgeklärt und anschließend bei 30.000 U/min für 2 Stunden bei + 4 °C in einer Ultrazentrifuge (L7, Beckmann; 45 Ti Rotor) pelletiert. Das Pellet wurde mit jeweils 1,5 ml PBS resuspendiert. Die Suspension wurde in 1 ml Portionen aufgeteilt und bei minus 80 °C aufbewahrt. Von der so gewonnenen Suspension wurde eine Titerbestimmung vorgenommen.

3.2.6.2 Immunisierung von Kaninchen

Jeweils 1 ml Virussuspension (Isolat Reovirus 26/00, Titer 10^6 je ml) wurde mit 1 ml komplettem Freund'schem Adjuvans bzw. für die nachfolgenden Impfungen 1 ml inkomplettes Freund'sches Adjuvans gut vermischt und je einem Kaninchen an mehreren Stellen in jeweils 0,2 ml Portionen intrakutan injiziert. Zweimal im Abstand von drei Wochen erfolgte eine Boosterung auf die gleiche Art. Um den Verlauf der Antikörpertiter bestimmen zu können, wurde unmittelbar vor jeder Impfung Blut aus der Vena saphena entnommen, dabei wurden Monovetten (92 x 11,5 mm; 0,5 ml Citrat, Sarstedt) verwendet. Eine Woche nach der letzten Boosterung wurde das Plasma durch Ausbluten über die Halsvene der Kaninchen gewonnen.

Tabelle 12: Impfplan der Kaninchen.

Isolat	Erstimpfung	Boosterung in Wochen nach Erstimpfung		
		nach 3	nach 6	nach 9
Reo 27/00	*	**	**	**

*komplettes Freund'sches Adjuvans

**inkomplettes Freund'sches Adjuvans

3.2.6.3 Aufbereitung des Blutplasmas von Kaninchen

Alle Blutproben wurden über Nacht bei + 4 °C aufbewahrt und anschließend 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert (GR 412, Jouan). Das überstehende Plasma wurde abpipetiert, 30 Minuten bei 56 °C im Thermoblock (TB1 Thermoblock, Biometra) hitzebehandelt und bis zur weiteren Verwendung bei –80 °C aufbewahrt.

3.2.6.4 Aufreinigung der Antikörper

Entfernen von Antikörpern gegen VH2-Zellen

Nicht infizierte Kulturen von VH2-Zellen wurden zweimal mit jeweils 5 ml PBS gewaschen, beim dritten Mal wurden 5 ml PBS in der Zellkulturflasche belassen und die Zellen mittels Spatel vom Flaschenboden gelöst. Die so gewonnene Suspension wurde bei 2000 U/min zentrifugiert (GR 412, Jouan) und der Überstand abpipetiert und verworfen. Das so gewonnene Pellet wurde mit dem Hitze-inaktiviertem Kaninchenserum resuspendiert und für 4 Stunden bei 37 °C auf einem Rüttler (WT 12, Biometra) inkubiert. Die Suspension wurde anschließend bei 2000 U/min zentrifugiert und das überstehende Blutplasma abpipetiert und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C aufbewahrt.

Entfernen von Antikörpern gegen FKS

Mittels Titration wurde bei einer kleinen Probe Kaninchenblutplasma diejenige Menge FKS ermittelt, welche zur vollständigen Ausfällung von FKS-Antikörpern führte. Dem Plasma wurde FKS zugegeben, anschließend bei 2000 U/min zentrifugiert (GR 412, Jouan), das überstehende Plasma abpipetiert und das Pellet verworfen. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis es nicht mehr zur sichtbaren Ausfällung kam. Dem Kaninchenplasma wurde dann die entsprechenden Menge FKS zugesetzt, für 1 Stunde bei 37 °C auf einem Rüttler (WT 12, Biometra) inkubiert und anschließend bei 2000 U/min zentrifugiert (GR 412, Jouan). Das überstehende Plasma wurde abpipetiert und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C aufbewahrt. Das so gewonnene Plasma und das Pellet wurden im Western Blot auf Antikörper gegen FKS und VH2-Zellen überprüft.

Western Blot

Die Gelelektrophorese wurde mit einem 7,5 %igen Trenngel durchgeführt. Nachdem die Glasplatten nach Anweisung flüssigkeitsdicht zusammengebaut worden waren, wurde zunächst das Trenngel (unteres Gel) hergestellt. Die oben aufgeführten Flüssigkeiten wurden zusammengemischt und dabei TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen zugegeben. Die Gellösung wurde dann luftblasenfrei in die Gelkammer gefüllt, mit Butanol überschichtet und zum Polymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen bis das Gel fest war. Danach wurde das Butanol entfernt und kurz mit Aqua dest. gespült und mit Filterpapier das Restwasser entfernt. Danach wurde das Sammelgel (oberes Gel) gegossen. In dieses Gel wurde im noch flüssigen Zustand ein Kamm eingesetzt, der im polymerisierten Gel für entsprechende Aussparungen (Slots) sorgte. Das so vorbereitete Gel wurde in die Gelkammer (Vertikale Elektrophoresekammer, Mighty Small II SE 250, Hoefer) verbracht. Die Kammer wurde mit dem Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt. Nach Säuberung der Slots mit Pufferlösung wurden die vorbereiteten Proben (Pellet 1:1 mit PBS aliquotiert, FKS und VH2-Zellsuspension) bzw. der Marker eingefüllt. Pro Slot wurde 20 µl Probenmaterial eingefüllt. Die Gelkammer wurde an eine Spannungsquelle (Spannungsgeber Electrophoresis Power Supply Modell 3000 Xi, BIO-RAD) angeschlossen. Das Gel lief ca. 1 Stunde bei 200 Volt und wurde, nachdem der Marker den unteren Rand der Kammer erreicht hatte, gestoppt.

Das Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten abgenommen und in den Transferpuffer überführt. Die Transfermembran (BioTraceTMPVDF Polyvinylidene Fluoride 0,45 µm, Pall Corporation), unmittelbar nachdem sie in Methanol geschwenkt wurde und insgesamt 8 Gelblotting-Papiere (300 x 600 mm GB 002, Schleicher&Schuell), die der Größe des Gels angepasst wurden, wurden ebenfalls für mindestens 10 Minuten in den Transferpuffer verbracht. Entgegengesetzt der Stromrichtung wurden erst vier Filterpapiere, die Membran, dann das Gel und zuletzt noch mal vier Filterpapiere aufeinander gestapelt. Jetzt wurde die Kammer (Fastblot B 44, Biometra) an eine Spannungsquelle (Spannungsgeber Electrophoresis Power Supply Modell 3000 Xi, BIO-RAD) angeschlossen.

Der Blot lief 1 Stunde, die dabei eingestellten mA berechneten sich nach folgender Formel: Größe der Gele in cm² x 2 x 0,65. Die Membran wurde anschließend zweimal für 10 Minuten in TBS gewaschen und über Nacht im Kühlschrank mit blocking stock geblockt. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween-Puffer gewaschen. Nun wurde der erste Antikörper (0,5 ml blocking stock, 9,5 ml TBS und 0,05 ml Kaninchenserum, entspricht einer Verdünnung von 1:200) aufgetragen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rüttler (WT 12, Biometra) inkubiert. Anschließend wurde die Membran wieder dreimal für 10 Minuten in TBS-Tween-Puffer gewaschen. Jetzt wurde der zweite Antikörper (0,5 ml blocking stock, 9,5 ml TBS und 0,01 ml anti-rabbit IgG (mit Peroxidase gekoppelt), entspricht einer Verdünnung

von 1:1000) aufgetragen und ebenfalls für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Rüttler inkubiert. Die Membran wurde dann zweimal für 10 Minuten mit TBS-Tween-Puffer gewaschen und abschließend mit deionisiertem Wasser gespült.

Aminoethylcarbazol-Färbung

Die Membran wurde mit der Färbelösung im Dunkeln für 5 bis 30 Minuten inkubiert. Sobald sich die Banden deutlich darstellten, wurde die Membran mit deionisiertem Wasser gewaschen, bevor sich der Hintergrund ebenfalls rot färbte. Zur Aufbewahrung, bis die gefärbte Membran fotografiert und ausgewertet wurde, diente deionisiertes Wasser.

Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu dem mitgefärbten Marker. Mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte der Markerproteine und deren Laufstrecken konnte ermittelt werden gegen welche Substanzen Antikörper in dem Kaninchenserum vorhanden waren.

3.2.6.5 Durchführung des Neutralisationstests

Der Neutralisationstest wurde in der β -Methode im Mikrotiterverfahren durchgeführt (BEARD, 1989). In 96-Well-Flachboden-Mikrotiterplatten (Becton Dickinson) wurden je Well 25 μ l BME vorgelegt. Je zwei Wells der ersten Spalte wurden mit 25 μ l Antiserum gefüllt und in \log_2 -Schritten über 8 Stufen verdünnt. In jedes Loch wurde anschließend 25 μ l Virussuspension mit ca. 100 KID₅₀ gegeben und nach einer Stunde Inkubation bei Zimmertemperatur nochmals 50 μ l VH2-Zell-Suspension dazugefüllt. Die mikroskopische Auswertung der Platten erfolgte nach 5 Tagen Bebrütung bei 28 °C mittels Beurteilung des cpE. Als Titer wurde der negative Logarithmus in \log_2 derjenigen Verdünnungsstufe angegeben, bei der noch kein cpE auftrat.

Zusätzlich wurde bei jedem Testansatz ein Kaninchen negativserum und eine Zellkontrolle mitgeführt sowie eine Virustitration zur Überprüfung des eingesetzten Virustiters durchgeführt.

3.2.7 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

3.2.7.1 Konzentrierung und Reinigung der Schlangen-Antikörper

Ammoniumsulfat-Fällung

Zu dem Schlangenserum wurden 33 % v/v Ammoniumsulfat gegeben und die Suspension für 10 Minuten bei 10 000 rpm zentrifugiert (GR 412, Jouan). Das so gewonnene Pellet wurde mit PBS resuspendiert und wieder auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt. Der Vorgang wurde wiederholt und das Pellet diesmal in auf pH 8 eingestelltem Trispuffer aufgenommen. Die Suspension wurde gegen auf pH 8 eingestellten Trispuffer dialysiert. Der Proteingehalt des so gewonnenen SAS cut wurde mit einem Photometer (Micronaut Skan 352, Labsystems) mit der Ascent Computersoftware bestimmt und mit Trispuffer (pH 8) auf einen Proteingehalt von 2 mg/ml eingestellt (HERBST und KLEIN, 1995).

Chromatographie (FPLC)

Der SAS cut wurde in eine Diethylaminoethyl (DEAE) Anionentauscher-Säule gegeben. Erst wurde die Säule mit 10 ml Tris-EDTA-Puffer gewaschen, dann 10 ml Probe (SAS cut, 2 mg/ml) auf die Säule gegeben, anschließend wurde nochmals mit 10 ml Tris-EDTA-Puffer gewaschen. Nun wurde der Salz-Gradient mit Tris-NaCl-Puffer durchgeführt und Fraktionen von je 1 ml aufgefangen (insgesamt 45). Der Verlauf wurde mit einem Drucker aufgezeichnet. Die Flow rate betrug 1ml/min. Die Fraktionen, die innerhalb eines Peak lagen, wurden gepoolt (HERBST und KLEIN, 1995).

Elektrophorese

Es wurde mit den gepoolten Fraktionen eine Gelelektrophorese durchgeführt um diejenige Fraktion zu ermitteln welche die Schlangenantikörper enthält (HERBST und KLEIN, 1995). Zur Untersuchung wurde ein 10 %iges Polyacrylamid-Trenngel eingesetzt, dem ein 5 % Sammelgel vorgeschaltet war. Nachdem die Glasplatten nach Anweisung flüssigkeitsdicht zusammengebaut worden war, wurde zunächst das Trenngel (unteres Gel) hergestellt. Die oben aufgeführten Flüssigkeiten wurden zusammengemischt und dabei TEMED und APS erst kurz vor dem Gießen zugegeben. Die Gellösung wurde dann luftblasenfrei in die Gelkammer gefüllt, mit Butanol überschichtet und zum Polymerisieren bei Raumtemperatur stehen gelassen, bis das Gel fest war. Danach wurde das Butanol entfernt und kurz mit Aqua dest. gespült und mit Filterpapier das Restwasser entfernt. Danach wurde das Sammelgel (oberes Gel) gegossen. In dieses Gel wurde im noch flüssigen Zustand ein Kamm eingesetzt, der im polymerisierten Gel für entsprechende Aussparungen (Slots) sorgte. Das so vorbereitete Gel wurde in die Gelkammer (vertikale Elektrophoresekammer, Mighty Small II SE 250, Hoefer) verbracht. Die Kammer wurde mit dem Elektrophorese-Laufpuffer gefüllt. Nach Säuberung der Slots mit Pufferlösung wurden die vorbereiteten Proben bzw. der Marker (peq Gold Protein-Marker) eingefüllt. Pro Slot wurde 20 µl Probenmaterial eingefüllt. Die Gelkammer wurde an eine Spannungsquelle (Spannungsgeber Electrophoresis Power Supply Modell 3000 Xi, BIO-RAD) angeschlossen. Das Gel lief ca. 1 Stunde bei 200 Volt und wurde, nachdem die durch das Bromphenolblau markierten Proben den unteren Rand der Kammer erreicht hatten, gestoppt.

Coomassie-Färbung

Das Gel wurde vorsichtig von den Glasplatten abgenommen. Das Sammelgel wurde abgetrennt, verworfen und nur das Trenngel für 20 Minuten unter Schwenken in die Fixierlösung gegeben. Danach wurde es für 5 Minuten in die Entfärbelösung gegeben. Anschließend wurde das Gel 10 Minuten lang gefärbt und hiernach wieder in den Entfärber gegeben, der nach jeweils 10 Minuten erneuert wurde bis sich die Banden ausreichend

darstellten. Zur Aufbewahrung, bis das gefärbte Gel fotografiert und ausgewertet wurde, diente Wasser.

Die Auswertung erfolgte im Vergleich zu dem mitgefärbten Marker. Mit Hilfe der bekannten Molekulargewichte der Markerproteine und deren Laufstrecken konnte die Fraktion ermittelt werden, welche die Schlangenantikörper (ca. 70 kD und 60 kD) enthielt.

3.2.7.2 Immunisierung von Kaninchen

Das Schlangenblutplasma für die Schlangenantikörpersuspension wurde aus den gepoolten Proben 170A und 104A gewonnen. Die Schlangenantikörpersuspension (1. Fraktion) wurde sterilfiltriert und anschließend auf den Proteingehalt hin gemessen und ggf. mit PBS eingestellt. Zur Immunisierung wurden Dosen zwischen 50-1000 µg/ml verwendet (HARLOW und LANE, 1988). Jeweils 1 ml Schlangenantikörpersuspension wurde mit 1 ml Freund'schem Adjuvans bzw. für die nachfolgenden Impfungen 1 ml inkomplettes Freund'sches Adjuvans gut vermischt und je einem Kaninchen an mehreren Stellen in jeweils 0,2 ml Portionen intrakutan injiziert. Zweimal im Abstand von drei Wochen erfolgte eine Boosterimpfung auf die gleiche Art. Um den Antikörpertiterverlauf bestimmen zu können, wurde unmittelbar vor jeder Impfung Blut aus der Vena saphena entnommen, dabei wurden Monovetten (92 x 11,5 mm; 0,5 ml Citrat, Sarstedt) verwendet. Eine Woche nach der letzten Boosterung wurde das Blut zur Plasmagewinnung entnommen.

Tabelle 13: Impfplan der Kaninchen.

Serum	Erstimpfung 60 µg/ml Protein	Boosterung mit Protein nach Wochen		
		3 300 µg/ml	6 90 µl/ml	9
170A und 104A	*	**	**	Serumgewinnung

*komplettes Freund'sches Adjuvans

**inkomplettes Freund'sches Adjuvans

3.2.7.3 Plasmaaufbereitung

Alle Blutproben wurden über Nacht bei + 4 °C aufbewahrt und anschließend 10 min bei 3000 U/min zentrifugiert (GR 412, Jouan). Das überstehende Plasma wurde abpipetiert, 30 Minuten bei 56 °C im Thermoblock (TB1 Thermoblock, Biometra) hitzebehandelt und bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 °C aufbewahrt.

3.2.7.4 Antikörperaufreinigung

Protein A Säule

Der pH des Kaninchenblutplasmas wurde auf 8,0 eingestellt, indem 1/10 Volumen Trispuffer (1M) zugegeben wurde. Ausgehend davon, dass Kaninchenblutplasma ca. 10 mg IgG /ml enthält (HARLOW und LANE, 1988), wurde das Säulentröhrchen mit 5 ml Protein A

Suspension befüllt. Anschließend wurde auf die Säule mit einem adaptierten Zentrifugenröhrchen dessen Boden entfernt worden war, 10 ml des so vorbereiteten Plasmas eingefüllt. Nachdem das Blutplasma durchgelaufen war, wurde die Säule mit 10 Säulenvolumina Trispuffer (0,1 M) und anschließend mit Trispuffer (0,01 M) gewaschen. Die Säule wurde dann mit Glycin (0,1 M) eluiert, es wurde die Elutionslösung auf die Säule gegeben, und jeweils 1,5 ml in Reaktionsgefäßen (Safe-Look Tubes 2 ml, Eppendorf) in denen 150 µl Trispuffer (1 M) vorgelegt war, aufgefangen. Durch Proteinmessung wurden diejenigen Fraktionen ermittelt, welche IgG enthielten und anschließend gepoolt (EY et al., 1978).

Die gepoolte Fraktion wurde anschließend für drei mal 30 Minuten in einem Kühlraum dialysiert. Die Fraktion wurde dabei in einen Dialyseschlauch gefüllt, der sich in einem 2000 ml Becherglas mit jeweils frischen PBS befand und mit einem Magnetrührer leicht in Bewegung gehalten wurde.

3.2.7.5 Durchführung des ELISA

Konjugation mit Peroxidase

Die IgG Konzentration wurde mit PBS auf 1 mg/ml eingestellt. Es wurde 1 mg EZ-Link™Plus Activated Peroxidase in 100 µl Aqua dest. gelöst und der Lösung zugegeben. Anschließend wurde 10 µl Reductant Solution zugegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde 20 µl Quench Puffer zugegeben und die Lösung für 15 Min bei Raumtemperatur nochmals inkubiert. Mit Glycerol wurde die Lösung auf eine Endkonzentration von 50 % gebracht, aliquotiert und bei minus 20 °C aufbewahrt.

ELISA

Die Platte (Nunc-Immuno™Platte, F96 Maxisorp, Nunc) wurde mit 100 µl/Well Virussuspension (Reo 26/00, 1:100 bzw. 1:50, Zellkulturüberstand mit Coating Buffer verdünnt) beschichtet, und über 24 h bei 4 °C inkubiert. Die Platte wurde 7mal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen, dann jedes Well mit 200 µl PBS mit 10 % FKS abgesättigt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde dreimal mit Tween-PBS-Puffer gewaschen, anschließend wurde ins erste Well je 200 µl der zu untersuchenden Schlangenserum (1:10, 20 µl + 180 µl PBS mit 10% FKS) pipettiert. In alle weiteren Wells wurden je 100 µl PBS mit 10 % FKS vorgelegt, und in log₂-Schritten über 12 Stufen verdünnt, dann wurde wieder für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde nun 7mal mit Tween-PBS-Puffer gewaschen, dann wurden die selbst hergestellten Kaninchen-Anti-Schlangen IgG Antikörper (1:100 in PBS mit 10 % FKS verdünnt) hinzugegeben und nochmals für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Wells 10mal mit Tween-PBS-Puffer gewaschen, je 100 µl ABTS-Lösung zugegeben, für 30 Minuten dunkel bei Raumtemperatur inkubiert, und danach bei einer Wellenlänge von 414 nm

gemessen (Photometer, Micronaut Skan 352, Labsystems) und ausgewertet. Als Kontrolle auf Funktionsfähigkeit des ELISA wurde ein Testdurchlauf in gleicher Weise mit Virussuspension des Isolats Adeno 27/00 und im VNT positiven Schlangenserum durchgeführt.

3.2.8 PCR (Polymerase Chain Reaction)

3.2.8.1 Isolation der DNS aus kernhaltigen Blutzellen

Zur DNS-Extraktion wurde ein Kit verwendet (DNeasy Tissue Kit 250, Qiagen). Die Durchführung fand nach Anweisung des Herstellers statt. Dabei wurden 5 µl Blutzellen mit 20 µl Proteinase K versetzt, dann wurde die Suspension auf ein Volumen von 220 µl mit PBS aufgefüllt. Anschließend wurden 200 µl Buffer AL zugegeben und die Probe kurz gevortext. Die Suspension wurde für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert (TB1 Thermoblock, Biometra). Danach wurde der Probe 200 µl Ethanol zugegeben und nochmals gevortext um eine homogene Suspension zu erhalten. Die so gewonnene Suspension wurde dann in eine DNeasy Mini Spin Colum überführt welche an ein 2 ml Hütchen adaptiert war und für eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf). Die DNeasy Mini Spin Colum wurde hiernach in ein neues 2 ml Hütchen verbracht und die untere Fraktion verworfen. Der Probe wurde nun 500 µl Buffer AW1 zugegeben und nochmals für 1 Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Auch hiernach wurde die untere Fraktion verworfen. Die DNeasy Mini Spin Colum wurde wieder in ein neues 2 ml Hütchen überführt und 500 µl Buffer AW2 zugegeben und anschließend für 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert, so dass die DNeasy Membran trocken war. Nun wurde die DNeasy Mini Spin Colum in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß (DNS-, DNase-, RNase- und Pyrogenfrei, Biozym) überführt und 100 µl Buffer AE zupipettiert, für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 1 Minuten bei 8000 rpm zentrifugiert. Die so gewonnenen DNS-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei minus 80 C° tiefgefroren.

3.2.8.2 Durchführung der PCR

Herstellung des Mastermixes (Prämix)

Alle Reagenzien mit Ausnahme des Wassers und der Taq-Polymerase wurden vor dem Pipettieren kurz auf einen Vortexer durchgemischt. Der Prämix wurde anschließend nochmals sorgfältig auf einem Vortexer durchgemischt.

Probenvorbereitung

0,5 µl der gewonnenen DNS wurde in ein Reaktionsgefäß (ThermoTube™PCR Tubes 0,5 ml, peqlab) überführt, in welchem sich der Mastermix befand und die Probe für 30 Sekunden (Short run) bei 9000 rpm zentrifugiert (Centrifuge 5415 D, Eppendorf) um sicherzustellen, dass die DNS, die im Paraffinöl hängen geblieben ist, in die Reaktionsflüssigkeit geschleudert wird. Als spätere Positivkontrolle wurde 1 µl der Retrovirus-DNS (FI 74, Gießen) in ein

Reaktionsgefäß überführt und in gleicher Weise behandelt. Die Proben wurden nun in den Thermocycler (TouchDown, Hybaid) mit folgendem Ablauf überführt:

Vorgang		Temperatur °C	Zeit
Denaturierung		94	2,5 Minuten
Zyklus	Denaturierung (Denaturation)	94	20 Sekunden
	Anlagerung der Primer (Annealing)	45	30 Sekunden
	Verlängerung der Primer (Extension)	72	1 Minute
DNS-Synthese (Extension)		72	5 Minuten

Insgesamt wurden 35 Zyklen, durchgeführt (TRISTEM, M., 1996), und die Proben anschließend bei 4 °C gekühlt.

3.2.8.3 Durchführung der Agarosegelelektrophorese

Das 1,5 %ige Agarosegel wurde kurz zum Aufkochen gebracht, leicht abgekühlt in den mit Kämmen vorbereiteten Gelträger gegossen und für ca. 20 Min zum Aushärten stehen gelassen. Es wurde darauf geachtet, dass das Gel luftblasenfrei war. Die Kammer (horizontale Elektrophoresekammer, Agagal Mini, Biometra) wurde mit TAE-Puffer (einfach) gefüllt. Anschließend wurde das fertige Gel mit dem Träger in die Kammer verbracht und das Gel mit Pufferlösung bedeckt. Je 20 µl Probe wurden mit 2 µl Beladungspuffer versetzt, als Negativkontrolle diente der Mastermix und als Positivkontrolle wurde Retrovirus-DNS (FI 74, Gießen) eingesetzt. Die so vorbereiteten Proben bzw. der Marker (100 bp-Marker) wurden eingefüllt. Pro Slot wurde 20 µl Probenmaterial eingefüllt. Die Gelkammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen. Die Elektrophorese lief ca. 1 Stunde bei 55 Volt Spannung und 33 Milliampere. Nachdem die durch das Bromphenolblau markierten Proben den unteren Rand des Gels erreicht hatten bzw. entsprechend weit gelaufen sind, wurde die Elektrophorese gestoppt. Das Gel wurde anschließend mittels UV-Transilluminator (Fluo-Link, Bachofer) ausgewertet und fotografiert.

4 Ergebnisse

Eine Zusammenfassung aller Ergebnisse aus den einzelnen Untersuchungen, der Blutaussstriche auf Vorhandensein von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen, der Passagierung des Probenmaterials auf VH2-Zellkulturen, der Virusneutralisation auf Vorhandensein von neutralisierenden Antikörpern gegen verschiedene Viren, bzw. der Hämagglutinationshemmungsteste sowie die Ergebnisse der PCR auf Vorhandensein retroviraler DNS-Sequenzen werden in Tabelle 18 dargestellt.

4.1 Virologische Untersuchungen

4.1.1 Virusisolierungen aus Blutproben in VH2-Zellkulturen

Getestet wurden insgesamt 153 Schlangenblutproben auf Virusgehalt. Diese stammten von 5 verschiedenen Schlangenarten von 13 verschiedenen Besitzern und 3 Ländern. Zusätzlich wurden bei einigen Tieren Organproben von Leber, Niere, Pankreas und Darm getestet.

Bis zur dritten Passage in VH2-Zellkulturen wurde aus keiner der Blutproben von 153 Schlangen ein cpE festgestellt, der auf einen Virusgehalt deuten könnte.

Bei der Wildtierpopulation von Schlangen aus Costa Rica, wurden zusätzlich noch Maul- und Kloakentupfer getestet (insgesamt 27 Proben). Auch bei der Untersuchung dieser Proben wurde in keiner der Passagen ein cpE beobachtet, der einen Hinweis auf die Gegenwart von zytopathogenen Viren geben könnte.

Die Detail-Ergebnisse aller getesteten Blutplasmaproben sind im Anhang als Tabelle 18 dargestellt.

4.2 Serologische Untersuchungen

4.2.1 Ergebnisse der Virusneutralisations- (VN) und HAH-Teste

4.2.1.1 Antikörpertiter in Blutplasma von Schlangen gegen verschiedene Reptilienviren

Adenovirus

Getestet wurden insgesamt 134 Blutplasmaproben aus Schlangen auf Antikörpergehalt. Diese stammten von 14 verschiedenen Schlangenarten aus 8 Beständen und 2 Ländern (D, CR). Bei den in Gefangenschaft gehaltenen Tieren, insgesamt 111, wurden neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren bei 28 Schlangen (25,2 %) nachgewiesen. Die Titerhöhen reichen von 1:2 bis 1:128 ($\log_2 = 1$ bis $\log_2 = 8$). Bei den positiven Tieren handelt es sich um 5 verschiedene Arten aus 8 verschiedenen Beständen und zwei verschiedenen Ländern. Insgesamt wurden

dabei 115 Schlangenblutplasmaproben von Boiden getestet, von denen 24 Tiere neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren zeigen, das entspricht 20,9 %. 19 Seren stammten von anderen Schlangenarten, von denen 4 Tiere neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren besaßen, das entspricht 21,1 %.

Bei der Wildtierpopulation aus Costa Rica werden von 23 getesteten Tieren bei 3 Tieren, zwei Boas und eine Bushmaster (*Lachesis stenophyris*), neutralisierende Antikörper gegen Adenoviren nachgewiesen, das entspricht 13 %.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Nachweis von virusneutralisierenden Antikörpern gegen Adenovirusisolat 27/2000.

Herkunfts-Land	Bestand	Schlangen-art	Anzahl der Proben mit VN-Titer (log ₂)							
			neg.	1	2	3	4	5	6	7
D	B 5A-12A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	5		1	2				
D	C 13A-26A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	4		1					1
D	E 45A-RB1A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	6							
D	F 64A-83A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	9				1		2	
D	G 103A-169A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	40	1			1	2	2	
D	H 171A-186A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	8	4	2	1			1	
D	O 9/1/03- 9/29/03	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	14		2	1				
CR	CR	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>) Bushmaster (<i>Lachesis stenophyris</i>)	20	1	1		1			
Gesamt	8		106	6	7	4	3	2	5	1

Paramyxoviren

Getestet wurden insgesamt 126 Blutplasmaproben aus Schlangen. Diese beinhalteten 14 verschiedene Schlangenarten aus 8 Beständen und 3 Ländern (D, I, CR).

Hämagglutinationshemmende Antikörper gegen das Paramyxovirus-Isolat 5688/1991 konnten bei 19 Schlangen nachgewiesen werden, das entspricht 15,6 %. Die Titerhöhen reichen von 1:2 bis > 256 ($\log_2 = 1$ bis $\log_2 \geq 8$). Bei den positiven Tieren handelt es sich um Schlangen der Gattungen Viperidae, Boidae und insgesamt um 12 verschiedene Arten, u.a. einer *Boa constrictor* aus Italien und einer Bushmaster (*Lachesis stenophrys*) aus Costa Rica.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 15: Nachweis von hämagglutinationshemmenden Antikörpern in Blutplasmaproben gegen das oPMV 5688/1991.

Herkunfts-Land	Be-stand	Schlangen-art	Zahl der Proben mit HAH-Titer (\log_2)									
			< 1	1	2	3	4	5	6	7	8	> 8
D	B 5A-12A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	8									
D	C 13A-26A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	6									
D	E 45A-RB1A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	6									
D	G 103A-169A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	47									
D	H 171A-186A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	16									
D	O 9/1/03- 9/29/03	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	2	2	2	1	3	4	1		1	3
I	I	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)						1				
CR	CR	Bushmaster (<i>Lachesis stenophrys</i>)	22					1				
Gesamt	8		107	2	2	1	3	6	1		1	3

Reovirus

Getestet wurden insgesamt 132 Blutplasmaproben aus Schlangen. Diese Proben stammten von 3 verschiedenen Schlangenarten aus 10 Beständen und 3 Ländern (D, I, CR). Neutralisierende Antikörper gegen Reovirus 26/2000 werden nur mit einem Titer von 1:4 bei einer Boa nachgewiesen.

Außerdem konnte auch bei einem Tier, aus dem Infektionsversuch mit Isolat Reo 26/2000 an der Justus-Liebig Universität Gießen, neutralisierende Antikörper mit einem Titer von 1:4 gegen Reovirus 26/2000 nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 dargestellt.

Eine Detail-Übersicht zu den Ergebnissen aller Virusneutralisationsteste (VN-Teste) bzw. aller Hämagglutinationshemmungsteste (HAH-Teste) gibt Tabelle 18 im Anhang wieder.

Tabelle 16: Nachweis von neutralisierenden Antikörpern in Blutplasmaproben gegen das Reovirus 26/2000.

Herkunfts-Land	Bestand	Schlangen-art	Zahl der Proben mit VN-Titer (log ₂)							
			neg.	1	2	3	4	5	6	7
D	B 5A-12A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	8							
D	C 13A-26A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	13							
D	D 27A-44A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	18							
D	E 45A-RB1A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	6							
D	F 64A-83A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	12		1					
D	G 103A-169A	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	47							
D	H 171A-186A		16							
D	N 17-3/29/01		4		1					
I	I	Abgottschlange (<i>Boa constrictor</i>)	1							
CR	CR		23							
Gesamt	10		130		2					

4.2.1.2 Antikörperbildung in Kaninchen

Reovirus-Antikörper

Da die Zellkulturüberstände nicht die erforderliche Höhe der Virusdtiter von mind. 10⁶ je Milliliter erreichten, wurde die Viruskonzentrierung und -reinigung durch Ultrazentrifugation gewählt, um das Virus zu konzentrieren und dabei auch aufzureinigen. Mit dem aus der Ultrazentrifugation gewonnenen Reovirusantigen konnte mit Hilfe der Adjuvanzen eine Antikörperproduktion in den Kaninchen angeregt werden. Nach Anwendung des Immunisierungsverfahrens mit dem Freund'schem Adjuvanz bildeten die Kaninchen, die mit dem Isolat Reovirus 26/00 geimpft wurden, neutralisierende Antikörper.

Tabelle 17: Neutralisationstiter gegen Reovirus der drei Kaninchen.

Kaninchen (Bezeichnung)	Nullproben	Boosterung nach Wochen		
		3	6	9
1 gr. Oben	< 2	1:16	1:32	1:64
2 w. unten	< 2	1:8	1:16	1:32
3 gr. Unten	< 2	1:16	1:32	1:128

Schlangenglobulin-Antikörper

Mit den aus der in der 1. Fraktion enthaltenen Schlangen-Immunglobulinen konnte mit Hilfe der Adjuvanzen eine Antikörperproduktion in den Kaninchen angeregt werden. Nach Anwendung des Immunisierungsverfahrens mit dem Freund'schem Adjuvanz bildeten die Kaninchen Antikörper gegen die Schlangenglobuline. Diese Antikörper konnten im ELISA mit einer Virussuspension des Isolats Adenovirus 27/2000 im VN-Test und positiven Schlangenseren nachgewiesen werden.

4.2.2 Ergebnisse des ELISA

Ziel des ELISA sollte sein, nicht neutralisierende Antikörper gegen Reoviren bei Schlangen nachzuweisen, da im VNT nur bei zwei Tieren der getesteten Schlangen Antikörper nachweisbar waren. Die Anti-Schlangen IgG-Antikörper konnten erfolgreich mit POD konjugiert werden, auch ein Test-ELISA mit Zellkulturüberstand, von mit Adenoviren infizierten VH2-Zellen, und Seren von Schlangen mit Antikörpertitern gegen Adenoviren war erfolgreich. Es konnte gezeigt werden, dass die zwei Schlangenseren (D 18, D177, mit Titern von 1:64 und 1:128) positiv reagierten und das als Negativkontrolle mitgeführte Serum (K 10) sowie die Kontrolle nicht reagierten. Jedoch konnte ein ELISA mit Reovirus-Antigen nicht etabliert werden, alle Seren sowie die mitgeführten Positivkontrollen (I 7, I 9) reagierten nicht.

4.3 Blutzelluntersuchungen

4.3.1 Nachweis von Einschlusskörperchen im Blutaussstrich

Es wurde von 182 Tieren Blutaussstriche angefertigt, nach Pappenheim bzw. Diss-Quik gefärbt und ausgewertet. Diese beinhalteten 5 verschiedene Schlangenarten aus 18 Beständen und 4 Ländern, darunter 177 Schlangen der Art *Boa constrictor*.

Von den in Gefangenschaft gehaltenen Tieren zeigten insgesamt 48 Schlangen, davon 46 Boas (*Boa constrictor*) und 2 Tigerpythons (*Python molurus*), intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in den Erythrozyten in der Färbung nach Pappenheim bzw. mit dem Diff-

Quik, das entspricht 26,4 %. Bei 6 Tieren liessen sich neben der Pappenheim-Färbung die Einschlüsse noch zusätzlich in der HE-Färbung darstellen. Darüber hinaus zeigten sie noch fluoreszierende Eigenschaften in der HE-Färbung. Zwei Tigerpythons (*Python molurus*) zeigten fluoreszierende Einschlüsse auch im nativen Blutaussstrich.

Die untersuchten Wildtiere aus Costa Rica waren alle frei von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in den Blutzellen.

Eine Übersicht aller Ergebnisse der Untersuchung der Blutaussstriche in den unterschiedlichen Anfärbungen und in der Fluoreszenz gibt Tabelle 18 im Anhang wider.

4.4 PCR

4.4.1 Nachweis von Retrovirussequenzen

Getestet wurden insgesamt 122 Schlangenblutplasmaproben. Diese beinhalteten 5 verschiedene Schlangenarten aus 13 Beständen und 3 Ländern.

Bei den in Gefangenschaft gehaltenen Tieren wurden von insgesamt 99 getesteten Tieren, davon 95 Abgottschlangen (*Boa constrictor*), bei 95 Schlangen retrovirale Gensequenzen nachgewiesen. Bei den positiven Tieren handelte es sich ausschließlich um Abgottschlangen (*Boa constrictor*). Bei den anderen Schlangenarten, Tigerpythons (*Python molurus*), Hundskopfboas (*Corallus caninus*) und Regenbogenboas (*Epicrates cenchria*), wurde kein Nachweis erbracht.

Bei der Wildtierpopulation aus Costa Rica wurden von insgesamt 23 getesteten Tieren bei allen Schlangen der Art *Boa constrictor* retrovirale Gensequenzen nachgewiesen. Bei der beprobten Buschmeister (*Lachesis stenophrys*) wurde keine spezifische Bande nachgewiesen.

Einige Proben wurden mehrfach getestet, bzw. bei fraglichem Ergebnis wurde die PCR wiederholt.

Eine Übersicht aller Ergebnisse der PCR-Untersuchung gibt Tabelle 18 im Anhang wieder.

5 Diskussion

Eine sichere *ante mortem*-Diagnostik der IBD ist eine große Herausforderung, weil bisher kein serologisches Testverfahren auf dem Markt erhältlich ist. Deshalb wird die Diagnose IBD häufig erst *post mortem* durch die histologische Untersuchung mittels Nachweis von typischen Einschlüssen in den Zellen viszeraler Organe einschließlich des Gehirns gestellt.

Für die *ante mortem*-Diagnostik wird zurzeit die Hämatologie einschließlich Differentialblutbild und Blutchemie (Leber-, Nierenparameter) sowie ein gefärbter Blutausstrich (HE, Diff-Quik, oder Pappenheim-Färbung) vorgeschlagen. Weiterhin wird die Biopsie von verschiedenen Organen, wie Leber, Tonsillen, Darm und Haut als Methode zur Diagnostik der IBD beschrieben (GARNER et al., 2004).

5.1 Blutuntersuchung

Die Untersuchung von Blutausstrichen auf Vorhandensein von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen zum Nachweis von IBD bei Schlangen, hat sich in der Praxis etabliert, so dass mit dieser Methode sehr viele Tiere auf IBD getestet werden. Mit dieser Methode kann nicht zwischen IBD-Einschlüssen und intrazytoplasmatischen Einschlüssen anderer Genese unterschieden werden. Diese Methode ist auch nicht geeignet eine Infektion mit dem IBD-Agens zum Zeitpunkt der Untersuchung sicher auszuschließen, da die Einschlüsse möglicherweise erst nach einiger Zeit *post infectionem* in den Blutzellen auftreten (HETZEL, mündl. Mitteilung, 2001; eigene Untersuchungen). Negative Ergebnisse bedeuten nicht, dass die Schlangen frei von viralen Infektionen sind, sondern nur, dass bis zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Einschlüsse gebildet bzw. detektiert worden sind.

Die Häufigkeit des Vorhandenseins intrazytoplasmatischer Einschlusskörperchen bei in Gefangenschaft gehaltenen Boas lässt sich darauf zurückführen, dass die Tiere ohne Quarantäne und veterinärmedizinische Untersuchung zusammengeführt werden und somit eine Verbreitung leicht möglich bzw. nicht zu verhindern ist.

Das Fehlen von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in den Blutzellen bei wildlebenden Boas bedeutet, dass diese Schlangen möglicherweise frei von einer Infektionserkrankung wie IBD sind, die mit der Bildung von Einschlüssen einhergeht. Da allerdings bisher nur sehr wenige Tiere untersucht worden sind, sollten die eigenen Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Probanden durchgeführt werden.

Zytoplasmatische Einschlusskörperchen bei Schlangen sind bereits häufig im Zusammenhang mit an IBD erkrankten Schlangen mit Krankheitssymptomen wie neurologischen Störungen,

gastrointestinalen Störungen und Stomatitiden beschrieben worden. Bei verschiedenen Schlangenarten, die mit Retroviren infiziert und an IBD erkrankt waren wurden intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen festgestellt (JAKOBSON et al., 1999, WOZNIAK et al., 2000), auch bei an IBD erkrankten Schlangen, aus denen Reo- und Adenoviren isoliert wurden, konnten Einschlusskörperchen nachgewiesen werden (MARSCHANG et al., 2001).

Das Färbeverhalten der in dieser Arbeit untersuchten Einschlüsse spricht für das Vorliegen von basischen Strukturen. Nur bei einigen Schlangen ließen sich die Einschlüsse auch in der HE-Färbung darstellen, diese Tiere zeigten neurologische Störungen und wurden euthanasiert.

Die unterschiedliche Anfärbbarkeit der intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen in den Erythrozyten lässt darauf schließen, dass es sich dabei um verschiedenartige Proteine oder Viruspartikel mit unterschiedlichen Eigenschaften handelt (CARLISLE-NOWAK et al., 1998; OROS et al., 1998; SCHUMACHER, 1992; WOZNIAK et al., 2000). Auch die fluoreszierenden Eigenschaften einiger Einschlüsse, die nur bei einigen Schlangen nachweisbar waren, deuten auf eine Proteinstruktur hin (HETZEL, mündl. Mitteilung 2004). Bei einigen Schlangenarten mit IBD konnte festgestellt werden, dass die intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen sich in Schiff-Methylen blau anfärben ließen, diese Eigenschaft weist auf das Vorhandensein von RNS hin (SCHUMACHER et al., 1994). Es gibt auch einen Bericht von einem Infektionsversuch, bei dem Viruspartikel die auf das Vorliegen eines Retrovirus schließen lassen, nachgewiesen wurden. Im selben Zusammenhang konnte auch ein 68 kd Protein nachgewiesen werden, welches als spezifisch für die bei der Einschlusskörperchenerkrankung der Riesenschlangen gefundenen Einschlüsse angesehen wurde (WOZINAK et al., 2000).

Ob und inwieweit die in dieser Arbeit nachgewiesenen intrazytoplasmatischen Einschlüsse in Blutzellen im Zusammenhang mit IBD stehen, kann nicht sicher festgestellt werden. Viele Tiere zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei klinische Symptome. Es kann nur spekuliert werden, ob diese Tiere zu einem späteren Zeitpunkt eine klinische Symptomatik entwickeln.

Derzeit gibt es keine eindeutigen Untersuchungsergebnisse, die einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten intrazytoplasmatischer Einschlusskörperchen in Blutzellen, dem Infektionszeitpunkt und zum Auftreten klinischer Symptome beweisen. Zur vollständigen Klärung der Frage, inwieweit sich die Einschlüsse unterscheiden und im Zusammenhang mit IBD stehen, sollten Proteinbestimmungen vorgenommen werden. Weiterhin könnten Infektionsversuche mit verschiedenen Virusisolaten sinnvoll sein, von denen angenommen werden kann, dass sie an der Ätiologie und Pathogenese der IBD beteiligt sein könnten, bzw. von Tieren isoliert wurden, die an IBD erkrankten. Infektionsversuche haben gezeigt, dass ca. 10 Wochen nach Infektion mit IBD Einschlüsse in den Hepatozyten nachweisbar waren (WOZNIAK et al., 2000). Bei Infektionsversuchen mit dem Isolat Reo 26/00

bei Boiden konnten bisher keine Einschlüsse in Blutzellen festgestellt werden, und ein Zusammenhang mit der Einschlusskörperchenerkrankung und dem verwendeten Reovirus bleibt vorerst fraglich (HETZEL, mündl. Mitteilung, 2003; SCHRAGEN, 2006). Bei *in vitro*-Versuchen mit dem Isolat Reo 26/00 und VH2-Zellkulturen kam es zum Auftreten von intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen (HETZEL, mündl. Mitteilung, 2004).

Das Auftreten von Einschlusskörperchen in Erythrozyten bei Pythons kann nur bei klinisch erkrankten Tieren beobachtet werden. In der Regel sind die Tiere aufgrund des schnellen Krankheitsverlaufs gestorben bevor die Einschlüsse im Blut nachgewiesen werden konnten (HETZEL, mündl. Mitteilung, 2004). Bei zwei an IBD erkrankten Pythons (*Python reticulatus*) aus einem Bestand, die mit ZNS-Symptomen in der Tierärztliche Hochschule Hannover eingestellt wurden, konnten bei einem der Tiere erst unmittelbar vor dem Tod intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen in den Erythrozyten nachgewiesen werden.

Der alleinige Nachweis von intrazytoplasmatischen Einschlüssen in den Blutzellen scheint nicht geeignet, die Diagnose IBD zu stellen.

5.2 Virologische Untersuchungen

5.2.1 Virusisolierungsversuche

Die eingesetzte Methode zur Isolierung von Reptilienviren über Reptilienzellkulturen bei Inkubationstemperaturen von 28 °C, ist in den letzten Jahren erfolgreich etabliert worden, so dass mit dieser Methode sehr viele Reptilienviren erstmals isoliert und beschrieben werden konnten (BLAHAK, 1994). Es kann von einer sicheren und erprobten Nachweismethode für Paramyxo-, Retro-, Reo-, und Adenoviren bei Reptilien gesprochen werden. Auch Reoviren und Adenoviren aus an IBD erkrankten Tieren konnten mittels VH2-Zellkultur erfolgreich isoliert werden (MARSCHANG et al., 2001).

Für das negative Ergebnis der eigenen Untersuchungen bedeutet dieses, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit die Schlangen frei von zytopathogenen Viren waren, zu diesem Zeitpunkt kein infektiöses Virus ausschieden, oder aber Infektionen mit Viren vorlagen, die sich in den eingesetzten Zelllinien nicht vermehren oder keinen CPE verursachen. Bei diesen Untersuchungen wurden VH2-Zelllinien gewählt, da es sich bei den untersuchten Tieren um Schlangen handelte, aber weitere Untersuchungen mit anderen Reptilien-Zelllinien, z.B. IgH2, könnten sinnvoll sein. Als weitere Ursache für falsch-negative Ergebnisse könnte ein unsachgemäßer Transport oder Lagerung der Proben zur Inaktivierung der Viren geführt haben.

5.3 Serologische Untersuchungen

5.3.1 VNT mit Reo-, Adeno- und PMV-Viren

Bei in Gefangenschaft gehaltenen Schlangen wurden bereits häufiger **Reovirusinfektionen** nachgewiesen (JACOBSON, 1985; AHNE et al., 1987; VIELER et al., 1994; MARSCHANG et al., 2001). Bis heute gibt es jedoch keinerlei Hinweis auf Reovirusinfektionen bei wildlebenden Boapopulationen.

Bei fast keiner der untersuchten Serum- bzw. Blutplasmaproben aus Schlangen konnten mittels VNT Antikörper gegen das eingesetzte Reovirus nachgewiesen werden.

Neutralisierende Antikörper gegen zwei in Deutschland aus Grünen Leguanen (*Iguana iguana*) isolierten Reoviren wurden bei klinisch gesunden, wildlebenden Großleguanen auf den mittelamerikanischen Inseln Utila und Roatan gefunden (GRAVENDYCK et al., 1998; AMMERMANN, 1999). Bei drei gemeinen Höckerechsen (*Xenosaurus grandis*) konnten ebenfalls Antikörper gegen ein Reovirusisolat nachgewiesen werden (MARSCHANG et al., 2002).

Das Fehlen von Antikörpern gegen das Reovirusisolat 26/00 bei wildlebenden Boas ließe sich eventuell auch durch die bekannten antigenetischen Unterschiede von Reoviren erklären. Bei Vögeln existiert eine große Vielzahl von unterschiedlichen Serotypen (HEFFELS-REDMANN und KALETA, 1992). Bei den für Reptilien spezifischen Reoviren ließe sich eine ähnlich hohe antigenetische Vielfalt vermuten (BLAHAK, 1995; OTT, 1998).

Weitere Untersuchungen mit verschiedenen Reovirusisolaten aus Reptilien könnten möglicherweise zum Nachweis von neutralisierenden Antikörpern bei Schlangen führen.

Keine der untersuchten Boas aus Costa Rica wies Krankheitssymptome oder Anzeichen einer Virusinfektion auf. Auch die Mehrzahl der untersuchten Tiere in Deutschland gehaltenen Schlangen wiesen zum Zeitpunkt der Untersuchung keinerlei Krankheitssymptome auf.

Ob Reoviren bei Schlangen klinisch apparente Infektionen bedingen können, ist nicht bekannt. Bei einer mit Reovirus infizierten Schlange konnte allerdings über neurologische Symptome berichtet werden (VIELER et al., 1994). Auch bei einer an einer PMV-Infektion erkrankten Schlange konnte neben Paramyxoviren ein Reovirus isoliert werden (BLAHAK, 1995). Aus an IBD erkrankten Tieren konnten ebenfalls Reoviren isoliert werden (MARSCHANG, 2001). Es lässt sich folglich vermuten, dass ähnlich der Reovirusinfektionen der Vögel eine Reovirusinfektion der Reptilien inapparent verläuft, jedoch durch Stressfaktoren bzw. Immunsuppression eine Erkrankung auslösbar ist und möglicherweise vor allem Jungtiere empfänglich sind.

Bei einer Vielzahl verschiedener Schlangenarten sind bisher **Adenovirusinfektionen** beschrieben worden unter anderen auch aus einer Boa Constrictor (*Boa constrictor*) (JACOBSON et al., 1985). Aus an IBD erkrankten Tieren konnten ebenfalls Adenoviren isoliert werden (MARSCHANG, 2001).

Die zum Teil deutlich positiven Antikörpertiter bei den in Gefangenschaft gehaltenen Tieren aber auch bei einigen Tieren aus Costa Rica zeigen, dass sich auch Schlangen in Wildtierpopulationen mit Adenoviren auseinandersetzen. Insgesamt lässt sich feststellen, dass Adenoviren bei Schlangen weit verbreitet sind. Es wird vermutet, dass sich Adenoviren ursprünglich in Reptilien entwickelt haben (FARKAS et al., 2002), dies könnte die hohe Prävalenz erklären.

Bis auf wenige Ausnahmen wies keine der untersuchten Schlangen zum Zeitpunkt der Probenentnahme Krankheitssymptome oder Anzeichen einer Virusinfektion auf. Es lässt sich folglich vermuten, dass eine Adenovirusinfektion der Reptilien inapparent verläuft, jedoch möglicherweise durch Stressfaktoren bzw. Immunsuppression, durch Erkrankungen wie IBD (MARSCHANG et al., 2001) oder im Zusammenhang mit anderen Erregern eine Erkrankung auslösbar ist.

Die vollständige Klärung der Frage, welche Rolle Reo- und Adenovirusinfektionen in Zusammenhang mit Erkrankungen bei Schlangen spielen, steht noch aus, wobei bei Infektionsversuchen mit dem Reovirus-Isolat 26/00 aus einer an IBD erkrankten Schlange bisher keine Infektion mit Krankheitsfolge möglich war (LAMIRANDE et al., 1999; HETZEL, mündl. Mitteilung 2004; SCHRAGEN, 2006).

Paramyxovirusinfektionen sind bisher bei verschiedenen Schlangenarten beschrieben worden. Der Nachweis hämagglutinationshemmender Antikörper gegen das getestete Paramyxovirusisolat war deshalb nicht unerwartet.

Es konnte gezeigt werden, dass auch eine Abgottschlange (*Boa constrictor*) an einer PMV-Infektion erkrankt war. Erkrankungen bei Abgottschlangen sind auch schon in der Vergangenheit beschrieben worden (BLAHAK et al., 1991; OROS et al., 2001). Bei einer Bushmaster (*Lachesis stenophrys*) aus Costa Rica welche in einer Giftschlangenfarm untergebracht war, in der mehrere Tiere der Familie Viperidae gestorben sind, konnte ebenfalls ein positiver Antikörper-Titer festgestellt werden. Die meisten positiven Tiere gehörten der Familie Viperidae an, bei denen PMV-Infektionen besonders häufig vorkommen, und alle positiven Tiere stammen aus einem Bestand.

Einige auf PMV-Antikörper im Hämagglutinationshemmungs-Test untersuchten Tiere zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung Krankheitssymptome, wie Pneumonien und zentral-nervöse Störungen. Positive Titer konnten allerdings auch bei Tieren ohne klinische Symptome nachgewiesen werden. PMV-Infektionen kommen besonders häufig bei Schlangen der Familie Viperidae vor, der die meisten der positiven Tiere angehören.

5.3.2 ELISA

Der ELISA gilt als sehr sensitive Nachweismethode. Da der Titer virusneutralisierender Antikörper, die gegen Reoviren gerichtet sind, bei den untersuchten Tieren möglicherweise zu niedrig war und so möglicherweise zu falsch negativen Ergebnissen geführt hat, bzw. keine neutralisierenden Antikörper vorhanden waren, sollte mittels ELISA der Antikörper-Titer überprüft werden.

Der erfolgreiche Nachweis von Antikörpern in Schlangen, die gegen Adenoviren gerichtet sind, zeigt, dass mit dem entwickelten ELISA spezifische Antikörper nachgewiesen werden können. Da der Titer des Zellkulturüberstandes der mit Reoviren infizierten VH2-Zellen ein Vielfaches über dem des Zellkulturüberstandes mit Adenoviren liegt, besteht die Möglichkeit, dass die Beschichtung mit Reovirus aus Zellkulturüberstand nicht erfolgreich ist. Dies kann evtl. an einem Ladungsunterschied im Vergleich mit den Adenoviren liegen, so dass bevorzugt FKS bindet. Ob tatsächlich Reoviren gebunden haben, lässt sich nicht überprüfen, da das Kaninchenserum aus dem ersten Tierversuch sowohl Antikörper gegen Reoviren als auch Antikörper gegen FKS enthält. Es wäre aus diesem Grunde sinnvoll Reoviren in Zellkulturen zu vermehren, denen kein FKS zugesetzt wird.

Eine weitere Möglichkeit für das negative Ergebnis wären serologische Unterschiede bei den Reptilien-Reoviren (BLAHAK et al., 1995; OTT, 1998), so dass das hier eingesetzte Serum keine Antikörper enthält, die an das hier eingesetzte Reovirusisolat binden.

Das negative Ergebnis dieser Untersuchung schließt jedoch nicht aus, dass die hier untersuchten Schlangen keine Antikörper gegen Reoviren zum Zeitpunkt der Untersuchung hatten.

5.4 PCR

Bei einer Vielzahl verschiedener Schlangenarten sind bisher Retrovirusinfektionen bzw. endogene Retroviren beschrieben worden, unter anderen auch aus Boas (*Boa constrictor*) (SCHUMACHER et al., 1994; JACOBSON, 1999; HUDER et al., 2002).

Die zum Teil deutlich positiven Banden bei den in Gefangenschaft gehaltenen Tieren aber auch bei den meisten Tieren aus Costa Rica zeigen dass auch Schlangen aus

Wildtierpopulationen über retrovirale Sequenzen verfügen. Insgesamt lässt sich feststellen, dass Retroviren bei Schlangen der Art *Boa constrictor* weit verbreitet sind. Das Fehlen von retroviralen Sequenzen bei den anderen untersuchten Schlangenarten, ließe sich dadurch erklären, dass nur sehr wenige Tiere im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, oder die untersuchten Tiere über endogene Retroviren verfügten, die nicht durch diese PCR erkannt wurden. Es wäre auch möglich, dass diese Arten tatsächlich nicht über Retrovirussequenzen in ihrem Genom verfügen, allerdings konnten auch schon bei Untersuchungen an Schlangen der Art *Python molurus* endogene Retroviren nachgewiesen werden (HUDER et al., 2002). Zur weiteren Klärung dieser Frage wären Untersuchungen anderer Schlangengattungen, mit einer größeren Anzahl von Probanden sinnvoll.

Die in dieser Arbeit eingesetzte PCR weist DNS, d.h. nur in das Genom integrierte virale Sequenzen nach, diese könnten von endogenen aber auch von exogenen Retroviren stammen. Weil die meisten der Schlangen (vergleiche Tabelle 18 im Anhang) keinerlei Krankheitssymptome zeigen und ausnahmslos alle Abgottschlangen (*Boa constrictor*) in der PCR positiv reagierten, lässt sich vermuten, dass es sich dabei um endogene Retroviren handelt, die in allen Zellen der Schlangen in das Genom integriert sind und vertikal über Keimbahnzellen übertragen werden.

Es wäre auch möglich, dass die Schlangen unter bestimmten Umständen zur Produktion von exogenen, infektiösen Partikeln durch ein Helfervirus aktiviert werden (DOERR und GERLICH, 2002). Dies könnte erklären, warum bei den virologischen Untersuchungen keine Retroviren nachgewiesen wurden, da die Schlangen möglicherweise zu diesem Zeitpunkt kein infektiöses Virus ausschieden.

Retrovirusinfektionen bei Schlangen werden häufig im Zusammenhang mit Neoplasien beschrieben (LUNGER et al., 1974; SCHUHMACHER et al., 1994). Es konnten bei an IBD erkrankten Tieren Retrovirus-Typ-C-artige Partikel nachgewiesen werden (SCHUHMACHER, 1992). Auch bei einem Infektionsversuch im Zusammenhang mit IBD konnten Viruspartikel nachgewiesen werden, die auf ein Retrovirus schließen lassen (WOZINAK et al., 2000). Aus Pythons (*Python molurus*) mit typischen Symptomen von IBD konnte ebenfalls ein Retrovirus isoliert und sequenziert werden, bei anderen Schlangenarten aus diesem Bestand konnte kein Virus isoliert werden, unabhängig davon, ob die Tiere an IBD erkrankt waren. Dies lässt hier darauf schließen, dass das gefundene Virus nicht im Zusammenhang mit IBD steht (HUDER et al., 2002).

Inwieweit Retrovirusinfektionen in Zusammenhang mit an IBD erkrankten Schlangen stehen, bleibt also auch anhand meiner Untersuchungen unklar.

6 Zusammenfassung

Im ausführlichen Literaturteil werden zunächst diejenigen Reptilienarten beschrieben, aus denen bisher Reo-, Adeno- und ophidian Paramyxoviren isoliert bzw. nachgewiesen wurden. Weiterhin werden die Morphologie, die Genomstruktur und die kodierten Proteine, die Virusreplikation, die Pathogenese, sowie die serologische Klassifizierung der Orthoreo-, Adeno-, Retro- und Paramyxoviren dargestellt. Die mit den Folgen dieser Infektionen verbundenen Krankheits-symptome werden aufgeführt.

Es wurden 182 **Blutausstriche** von Schlangen auf das Vorhandensein intrazytoplasmatischer Einschlüsse untersucht. Bei 46 Boas (*Boa constrictor*) konnten in Erythrozyten Einschlusskörperchen festgestellt werden. Bei zwei Tigerpythons (*Python molurus*) wurden nach Pappenheim-Färbung ebenfalls intrazytoplasmatische Einschlüsse in Erythrozyten dargestellt. Einige weitere Tiere besitzen Einschlüsse, die zusätzlich in der HE-Färbung detektiert wurden und zudem fluoreszierende Eigenschaften besaßen. Bei zwei Tieren, die klinische Symptome zeigten, konnte Fluoreszenz auch im nativen Blutausstrich beobachtet werden.

Die **Virusisolierung** aus Blut- und Organproben sowie Kloaken- und Rachen-abstrichen blieb erfolglos, weil in der VH2-Zellkultur das Auftreten eines cpE nicht festgestellt werden konnte.

Zusätzlich wurden **serologische Untersuchungen** mit 134 Zitratblutplasmaproben von Schlangen im Neutralisationstest (VN-Test) auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Reo- und Adenovirus durchgeführt. Neutralisierende Antikörper gegen Reovirus 26/2000 konnten nur bei einem Tier aus einem Infektionsversuch mit Reovirus gefunden werden. Eine Vielzahl der Tiere in Gefangenschaft (15,3 %) und auch in der Wildtierpopulation (10,7 %) weisen neutralisierende Antikörper gegen das Adenovirus 27/2000 auf.

Außerdem wurde mittels Hämagglutinationshemmungs-Test (HAH-Test) auf Antikörper gegen ein ophidian Paramyxovirus (oPMV) getestet. Antikörper gegen das Paramyxovirus (Isolat 5688/91) konnten bei einer *Boa constrictor* nachgewiesen werden.

In zwei Versuchen konnte in Kaninchen die Antikörperbildung, jeweils gegen ein Reovirus (Isolat 26/2000) und gegen Schlangenantikörper IgG (*Boa constrictor*) angeregt werden, welche im Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) eingesetzt wurden. Dabei zeigte sich, dass ein Nachweis von Antikörpern gegen Adenovirus 27/2000 mit dem etablierten ELISA erfolgreich ist, aber gegen Reovirus 26/2000 nicht gelang.

Mit der Untersuchung von 99 Schlangenblutplasmaproben, darin enthalten 23 Wildfänge aus Costa Rica, konnte mittels Polymerase Chain Reaction (PCR) gezeigt werden, dass ein

Großteil der in Gefangenschaft lebenden (66,7 %) und auch wildlebende Schlangen der Art *Boa constrictor* (100 %) über endogene retrovirale Sequenzen verfügen.

7 Summary

Screening of blood plasma samples derived from free-living and captive snakes for antibodies against reo-, adeno- and ophidian paramyxoviruses, cytopathogenic viruses, retroviral DNA and intracytoplasmic inclusions in circulating blood cells

The literature review contains a detailed description of reptiles that have been infected with reo-, adeno-, retro- and paramyxoviruses. The morphology, genome structure, proteins, replication and pathogenesis, and the classification of these viruses are described. The clinical signs associated with these viral infections are presented.

A total of 182 blood smears from snakes were tested for intracytoplasmic inclusions. Inclusions were detected in 46 smears from boas (*Boa constrictor*). Using the Pappenheim stain for blood smears, two tiger pythons (*Python molurus*) had intracytoplasmic inclusions in their erythrocytes. Additional snakes also had inclusions that were detectable following staining with haematoxyline-eosine. These inclusions displayed fluorescent properties. Fluorescence of inclusions in the erythrocytes was observed in unstained blood smears from two snakes.

Virus isolation was unsuccessful from samples of blood plasma, various internal organs and swabs from pharynx and cloaca. No cytopathic changes were seen in inoculated VH2 cell cultures.

Serological tests for antibodies in virus neutralisation assays were performed on 134 citrate blood plasma samples using reo- and adenoviruses as antigens. Neutralizing antibodies against reovirus strain 26/2000 were detected only in two animals that derived from a previous transmission experiment. In contrast, blood plasma samples from numerous captive snakes (15.3 %) and free-living snakes (10.7 %) contained neutralizing antibodies against adenovirus 27/2000.

Using the haemagglutination inhibition test and an ophidian paramyxovirus (oPMV) strain 5688/1991 as antigen, only one boa (*Boa constrictor*) had anti-PMV antibodies.

In two experiments with rabbits, antibodies were raised against reovirus strain 26/2000 and snake immunoglobulins. These antibodies were used in an enzyme immunosorbent assay. It was possible to detect antibodies against adenovirus 27/2000 but not against reovirus 26/2000 in this test.

Using the **polymerase chain reaction** 99 blood plasma samples, which also included wild-cought snakes from Costa Rica, were tested for the presence of endogenous retroviruses. It

was possible to demonstrate retroviral DNA sequences in the majority of captive snakes (66.7 %) and all wild-caught boas (100 %).

8 Literaturverzeichnis

Ahne, W., I. Thomsen, J. Winton (1987)

Isolation of reovirus from the snake, *Python regius*.
Archives of Virology **94**, 135-139.

Ahne, W., W. J. Neubert, I. Thomsen (1987)

Reptilian viruses: Isolation of Myxovirus-like Particles from the snake *Elaphe oxycephala*.
Journal of Veterinary Medicine B **34**, 607-612.

Ahne, W., P. Scheinert (1989)

Reptilian viruses: isolation of parvovirus-like particles from corn snake *Elaphe guttata* (Colubridae).
Journal of Veterinary Medicine B **36**, 409-412.

Ahne, W., W. J. Neubert (1989)

Antigenic relationship between three members of paramyxoviridae isolated from different snakes. In: Ahne W. W. and E. Kurstak (eds.). Viruses of lower vertebrates.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 105-113.

Ahne, W., W. J. Neubert (1991)

Isolation of paramyxovirus-like agents from Teju (*Callisotus maculatus*) and Python (*Python regius*). Proceedings of the 2nd International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates, 29-31 July 1991, Oregon State University, Corvallis, USA, pp. 203-210.

Ahne, W. W., J. Adrian, A. Mayr (1999a)

Replication of reptilian paramyxovirus in avian host systems.
Journal of Veterinary Medicine B **46**, 57-62.

Ahne, W., W. J. Neubert, N. Batts, G. Kurath, J. R. Winton (1999b)

Comparative sequence analyses of sixteen reptilian paramyxoviruses.
Virus Research **63**, 65-74.

Ammermann, P. (1999)

Klinische Untersuchung wildlebender Großleguane (*Ctenosaura bakeri*, *Ctenosaura similis* und *Iguana iguana*) auf den Inseln Utila und Roatan (Honduras, Mittelamerika) mit virologischen, bakteriologischen, mykologischen und parasitologischen Beiträgen sowie Angaben ausgewählter Blutparameter.
Dissertation, Fachbereich Veterinärmedizin, Justus-Liebig Universität Giessen.

Astawa, N. M., G. E. Wilcox (1996)

Association between surface proteins of avian reovirus and virusinduced fusion of cells.
Proceedings of International Symposium on Adenovirus and Reovirus Infections in Poultry, Rauschholzhausen, Germany, 24.-27.6.1996, pp. 222-230.

Axthelm, M. K. (1985)

Clinicopathologic and virologic observations of a probable viral disease affecting boid snakes.
Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians, pp. 108-109.

Beard, C. W. (1989)

Serologic procedures. In: Purchase, H. G., L. H. Arp, C. H. Domermuth and J. E. Pearson (eds.). A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 2nd. ed.
American Association of Avian Pathologists, Dubuque, Iowa, pp. 192-194.

Benkö, M., B. Harrach (1998)

A proposal for establishing a new (third) genus within the Adenoviridae family.
Archives of Virology **143**, 829-837.

Benkő, M., B. Harrach, W. C. Russel (2000)

Family Adenoviridae. In: van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle und R. B. Wicker (eds.) .Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 227-238.

Benkő, M., B. Harrach, W. C. Russel (2002)

First molecular evidence for the existence of distinct fish and snake adenoviruses.
Journal Virology, 76(19), 10056-10059.

Benkő, M., B. Harrach, G. W. Both, W. C. Russel, B. M. Adair, E. Adam, J. C. de Jong, M. Hess, M. Johnson, A. Kajon, A. H. Kidd, H. D. Lehmkuhl, Q.-G. Li, V. Mautner, P. Pring-Akerblom and G. Wadell (2005)

Family Adenoviridae. In: C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger & L. A. Ball (Eds.). Virus Taxonomy. VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses pp. 213-228.

Biermann, R. (1995)

Isolierung und Charakterisierung von Herpesviren bei Landschildkröten.
Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

Blahak, S., Th. Göbel (1991)

A case report of a reovirus-infection in an Emerald tree boa (*Corallus caninus*).
4th. International Colloquium on Pathology and Medicine of Reptiles and Amphibians, Bad Nauheim, 27.-29.09.91, pp. 13-16.

Blahak, S. (1993)

Investigations on reoviruses from snakes and iguana.
Proceedings of the Second World Congress of Herpetology, Adelaide, Australia, 29.12.93 - 6.01.94.

Blahak, S. (1994)

Untersuchungen zum Vorkommen von Paramyxoviren bei Schlangen und Charakterisierung ausgewählter Isolate.
Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

Blahak, S. (1995)

Isolation and characterisation of paramyxoviruses from snakes and their relationship to avian paramyxoviruses.
Journal of Veterinary Medicine B **42**, 216-224.

Blahak, S., I. Ott, E. Vieler (1995)

Comparison of six different reoviruses of various reptiles.
Veterinary Research **26**, 470-476.

Chandra, A. M., E. R. Jacobson, R. J. Munn (2001)

Retroviral particles in neoplasms of Burmese pythons (*Python molurus bivittatus*).
Veterinary Pathology **38**, 561-564.

Carlisle-Nowak, M. S., N. Sullivan, M. Cardigan, C. Knight, C. Ryan, E. R. Jacobson (1998)

Inclusion body disease in two captive Australian pythons (*Morelia spilota variegata* and *Morelia spilota spilota*).

Australian Veterinary Journal **76**, 98-100.

Davison, A. J., K. M. Wright, B. Harrach (2000)

DNA sequence of frog adenovirus.
Journal of General Virology **81**, 2431-2439.

Doerr, H., W., W. H. Gerlich (2002)

Medizinische Virologie, Grundlagen, Diagnostik und Therapie virologischer Krankheitsbilder.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

Duncan, R., Z. Chen, S. Walsh, S. Wu (1996)

Avian reovirus-induced syncytium formation is independent of infectious progeny virus production and enhances the rate, but is not essential, for virus-induced cytopathology and virus egress.
Virology **224**(2), 453-464.

Duncan, R., J. Corcoran, J. Shou, D. Stoltz (2004)

Reptilian Reovirus: a new fusogenetic orthoreovirus species.
Virology **319**(1), 131-140.

Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball (2005)

Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses (ICTV).
Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA.

Farkas, L. S., M. Benko, P. Elo, K. Ursu, A. Dan, W. W. Ahne, B. Harrach (2002)

Genomic and phylogenetic analyses of an adenovirus isolated from a corn snake (*Elaphe guttata*) imply a common origin with members of the proposed new genus Atadenovirus.
Journal of General Virology **83**, 2403-2410.

Farkas, L. S., Z. Zadori, M. Benko, S. Essbauer, B. Harrach, P. Tijssen

A parvovirus isolated from royal python (*Python regius*) is a member of the genus Dependovirus.
J. Gen. Virol. **85**(3), 555-61.

Fleming, G. J., J. Heard, E. R. Jacobson, C. Buergelt (2003)

Cytoplasmic inclusions in corn snakes *Elaphe guttata*, resembling inclusion body disease of boid snakes,
Journal Herpetological Medicine and Surgery **13**, 18-22.

Fölsch, D. H., P. Leloup (1976)

Fatale endemische Infektion in einem Serpentarium.
Tierärztliche Praxis **4**, 572-536.

Franke J., S. Essbauer, W. W. Ahne, S. Blahak (2001)

Identificaton and molekular characterization of 18 paramyxoviruses isolated from snakes.
Virus Research **80**, 67-74.

Fry, F. L., R. J. Munn, M. Gardiner, S. L. Barten, L. B. Hadfey (1994)

Adenovirus-like hepatitis in a group of related Ranking's dragon lizards (*Pogona henrylawsoni*).
Journal of Zoo and Wildlife Medicine **25**, 167-171.

Garner M. T., R. T. Raymond, R. T. Nordhausen, E. R. Jacobson (2000)

Eight cases of inclusion body disease in captive palm vipers (*Botriechis marchi*).
Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians and IAAAM, pp. 45-47.

Gravendyck, M., P. Ammermann, R. E. Marschang, E. F. Kaleta (1998)

Paramyxoviral and reoviral infections of iguanas on Honduran Islands.
Journal Wildl. Dis. 34(1), 33-38.

Harlow, E., D. P. Lane (1988)

Antibodies, a laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Harrach, B. (2000)

Reptile adenovirus in cattle?
Acta Veterinaria Hungariae **48**, 485-490.

Heffels-Redmann, U., E. F. Kaleta (1992)

Reovirusinfektionen. In: Heider, G. und G. Monreal (Hrsg.). Krankheiten des Wirtschafts-
geflügels.
Gustav Fischer Verlag, Jena, . Bd. II, S. 525-551.

Heldstab, A., G. Bestetti (1984b)

Virus associated with gastrointestinal disease in snakes.
Journal of Zoo Animal Medicine **15**, 118-128.

Herbst, L. H., P. A. Klein (1995)

Monoclonal antibodies for the measurement of class-specific antibody responses in the green
turtle (*Chelonia mydas*).
Veterinary Immunology and Immunopathology **46**, 317-335.

Horzinek, M. C. (1985)

Kompendium der allgemeinen Virologie.
Paul Parey Verlag, Berlin und Hamburg, S. 108 und 142-143.

Homer, B. L., J. P. Sundberg, J. M. Gaskin, J. Schuhmacher, E. R. Jacobson (1995)

Immunoperoxidase detection of ophidian paramyxovirus in snake lung using a polyclonal
antibody.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigations **7**, 72-77.

Huder, J. B., J. Böni, J.-M. Hatt, G. Soldati, H. LUTZ, J. Schüpbach (2002)

Identification and characterization of two closely related unclassifiable endogenous retroviruses
in Pythons (*Python molurus* and *Python curtus*).
Journal of Virology **76**, 7607-7615.

Huther, S. (1996)

Identifizierung und Charakterisierung von Reoviren aus verschiedenen Ziervogelarten.
Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses (2005)

Structural, Genomic, Physicochemical and Replicative Properties of Viruses Used in
Taxonomy.
Elsevier Academic Press, San Diego, California, USA.

Ippen, R., Z. Mladenov, A. Konstantinov (1978)

Leukose mit elektronenoptischem Virusnachweis bei zwei Abgottschlangen (*Boa constrictor*),
Schweizer Archiv für Tierheilkunde **120**, 357-368.

Jacobson, E. R., C. Seely, M. N. Novilla (1980)

Lymphosarcoma associated with virus-like intranuclear inclusions in a California king snake

(Colubridae: Lampropeltis).

Journal of the National Cancer Institute (Bethesda) **65**, 577-583.

Jacobson, E. R., C. H. Gardiner, C. M. Fogging (1984)

Adenovirus-like infection in two Nile crocodiles.

Journal of the American Veterinary Medical Association **185**, 1421-1422.

Jacobson, E. R., J. A. Gaskin, C. H. Gardiner (1985)

Adenovirus-like infection in a *Boa constrictor*.

Journal of the American Veterinary Medical Association **187**, 1226-1227.

Jacobson, E. R. G., L. Kollias (1986)

Adenovirus-like infection in a Savannah monitor.

Journal of the American Veterinary Medical Association **187**, 149-151.

Jacobson, E. R., C. H. Gardiner (1990)

Adenovirus-like virus in esophageal and tracheal mucosa of a Jackson's chameleon (*Chameleo jacksoni*).

Veterinary Pathology **27**, 210-212.

Jacobson, E. R., W. Kopit, F. A. Kennedy, R. S. Funk (1996)

Coinfection of a bearded dragon (*Pogona vitticeps*) with adenovirus- and dependovirus-like viruses.

Veterinary Pathology **33**, 343-346.

Jacobson, E. R., J. Oros, S. J. Tucker, D. P. Pollock, K. L. Kelley, R. J. Munn, B. Y. Lock, A. Mergia, J. K. Yamamoto (2001)

Partial characterization of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease.

American Journal of Veterinary Research **62**, 217-224.

Jaenisch, R. (1976)

Germ line integration and Mendelian transmission of the exogenous Moloney leukaemia virus.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 1260-1264.

Jaenisch, R. (1979)

Moloney leukaemia virus gene expression and gene amplification in preleukemic and leukemic BALB/Mo mice.

Virology **93**(1), 80-90.

Joklik, W. K. (1981)

Structure and function of the reovirus genome.

Microbiological Reviews **45**, 483-501.

Juhasz, A., W. W. Ahne (1992)

Physicochemical properties and cytopathogenicity of an adenovirus-like agent isolated from corn snake (*Elaphe guttata*).

Archives of Virology **130**, 429-439.

Julian, A. F., J. K. Durham (1982)

Adenoviral hepatitis in a female bearded dragon (*Amphobilurus barbatus*).

New Zealand Veterinary Journal **30**, 59-60.

Kinsel, M. J., R. B. Barbiere, A. Manharth, R. D. Murnane (1997)

Small intestinal adeno-like virus in a mountain chameleon (*Chameleo montium*).

Journal of Zoo and Wildlife Medicine **28**, 498-500.

Kim, D.Y., M. A. Mitchell, R. W. Bauer, R. Poston, D.-Y. Cho (2002)

An outbreak of adenoviral infection in inland bearded dragons (*Pogona vitticeps*) coinfecting with dependovirus and coccidial protozoa (*Isospora* sp.)
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation **14**, 332-334.

Konstantinov, A., R. Ippen (1982)

Erythroleukosis with presence of virus particles in two *Boa constrictor*.
Proceedings of International Colloquium on Pathology of Reptiles and Amphibians **1**, 123-128.

Lancz, G. J. (1973)

Rapid method for the concentration and partial purification of herpes simplex viruses types 1 and 2.
Archiv für die gesamte Virusforschung **42**, 303-306.

Lamirande, E. W., D. K. Nichols, J. W. Owens, J. A. Gaskin, E. R. Jacobson (1999)

Isolation and experimental transmission of a reovirus pathogenic in ratsnakes (*Elaphe* species).
Virus Research **63**, 135-141.

Lamb R. A., D. Kolakofsky (2001)

Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Channock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.), Field's Virology, 4th ed., Lippincott Williams und Wilkins, Philadelphia, pp. 577-604.

Linial, M. L., Fan, H., Hahn, B., Lwer, R., Neil, J., Quackenbush, S., Rethwilm, A., Sonigo, P., Stoye, J., and Tristen, M. (2005)

Family Retroviridae. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. (eds.). Virus taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier, Amsterdam, pp. 421-440.

Lock, B. A., L. G. Green, E. R. Jacobson, P. A. Klein (2003)

Use of an ELISA for detection of antibody responses in Argentine boa constrictors (*Boa constrictor occidentalis*).
American Journal of Veterinary Research **64**, 388-395.

Lunger, P. D., W. D. Hardy, H. F. Clark (1974)

C-type virus particles in a reptilian tumor.
Journal of the National Cancer Institute **52**, 1231-1235.

Lunger, P. D., H. F. Clark (1977)

Intracytoplasmatic type A particles in viper spleen cells.
Journal of the National Cancer Institute **58**, 809-811.

Mallucci, L., A. C. Allison (1965)

Lysosomal enzymes in cells infected with cytopathic and noncytopathic viruses.
Journal of Experimental Medicine **121**, 477.

Marschang, R. E. (2000)

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

Marschang, R. E., U. Hetzel, D. Schwarz, R. Michling, K. Mathes (2001)

Virologische Untersuchungen an Riesenschlangen (*Boa constrictor*) mit Einschlusskörperchen-Krankheit (IBD).

Deutsche Gesellschaft für Herpetologie und Terrarienkunde, Berichte der 17. Arbeitstagung der AG ARK, 6-7.10.2001.

Marschang, R. E., S. Donahoe, R. Manvell, J. Lemos-Espinal (2002)

Paramyxovirus and reovirus infections in wild-caught Mexican lizards (*Xenosaurus* and *Abronía* spp.),
Journal of Zoo Wildlife Medicine **33**, 317-321.

Mayr, A., P. A Bachmann, B. Mayr-Bibrack, G. Wittmann (1989)

Virologische Arbeitsmethoden.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York. Band I-III.

Martin, J., E. Herniou, J. Cook, R. W. O'Neill, M. Tristem (1999)

Interclass transmission and phyletic host tracking in murine leukaemia virus-related retroviruses.
Journal of Virology **73**, 2442-2449.

Modrow, S., D. Falke, U. Truyen (2003)

Molekulare Virologie.
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, S. 265-299.

Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, M. D. Summers (1995)

Reoviridae. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Channock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.), Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses.
Springer-Verlag, Wien, New York, pp. 208-239.

Ni, Y., R. F. Ramig (1993)

Characterization of avian reovirus-induced cell fusion: the role of viral structural proteins.
Virology **194**(2), 705-714.

Ogawa, M., W. W. Ahne, S. Essbauer (1992)

Reptilian viruses: adenovirus-like agent isolated from royal python (*Python regius*).
Journal of Veterinary Medicine B **39**, 732-736.

Oros, J., S. Tucker, E. R. Jacobson (1998)

Inclusion body disease in two captive boas in the Canary Islands.
Veterinary Record **143**, 283-285.

Oros, J., H. Lorenzo, M. Andrada, J. Recuero (2004)

Type A-like retroviral particles in a metastatic intestinal adenocarcinoma in an emerald tree boa (*Corallus caninus*).
Veterinary Pathology **41**, 515-518.

Ott, I. (1998)

Identifizierung und Charakterisierung von Reoviren aus verschiedenen Schlangen und Leguanen.
Veterinärmedizinische Dissertation, Gießen.

Ouchterlony, O. (1949)

Antigen-antibody reaction in gels. II. Factors determining the site of precipitate.
Arkiv foer Kemi **1**, 103-109.

Potgieter, L., R. E. Sigler, R. G. Russel (1987)

Pneumonia in Ottoman vipers (*Vipera xanthena xanthena*) associated with a parainfluenza-2-like virus.

Journal of Wildlife Diseases **23**, 355-360.

Ramig, R. F., B. N. Fields (1983)

Genetics of reovirus. In: W. Joklik (ed.). The reoviridae, Plenum, New York, pp. 197-228.

Ramis, A., H. Fernandez-Bellon, N. Majo, A. Martinez-Silvestre, K. Latimer, R. Campagnoli, B. G. Harmon, C. R. Gregory, W. L. Steffens, S. Cubb, M. Crane (2000)

Adenovirus hepatitis in a boa constrictor (*Boa constrictor*).

Journal of Veterinary Diagnostic Investigations **12**, 573-576.

Raymond, R. T., M. T. Garner, R. T. Nordhausen, E. R. Jacobson (2001)

A disease resembling inclusion body disease of boid snakes in captive palm vipers (*Bothriechis marchi*).

Journal of Veterinary Diagnostic Investigations **13**, 82-86.

Raymond, R. T., M. M. Garner, S. Murray, R. T. Nordhausen (2002)

Oroesophageal adenovirus-like infection in a palm viper, *Bothriechis marchi*, with inclusion body-like disease.

Journal of Herpetology and Medical Surgery **12**, 30-32.

Raymond, R. T., M. Lamm, R. Nordhouse, K. Latimer, M. M. Garner (2003)

Degenerative encephalopathy in a costal mountain kingsnake (*Lampropeltis zonata multifasciata*) due to adenoviral-like infection.

Journal of Wildlife Diseases **39**, 431-436.

Reavill, D. R., P. Helmer und R. E. Schmidt (2003)

Reovirus outbreak in Arizona mountain king snakes (*Lampropeltis pyromelana pyromelana*).

Proc. Assoc. Rept. Amph. Vet. 58

Richter, G. A., B. L. Homer, S. A. Moyer, D. S. Williams, G. Scherba, S. J. Tucker, B. J. Hall, J. C. Pedersen, E. Jacobson (1996)

Characterisation of paramyxoviruses isolated from three snakes.

Virus Research **43**, 77-83.

Robertson, M. D., G. E. Wilcox (1986)

Avian Reovirus.

The Veterinary Bulletin **56**, 155-174.

Rolle, M., A. Mayr (1993)

Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre.

Enke Verlag, Stuttgart.

Samour, H. J., D. Riesley, T. March, B. Savage, O. Nievea, M. Jones (1984)

Blood sampling techniques in reptiles.

Veterinary Record **114**, 472-476.

Schiff, L. A., B. N. Fields (1990)

Reoviruses and their replication. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Channock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.). Virology, second edition.

Raven Press, Ltd., New York pp. 1275-1306.

Shmulevitz, M., R. Duncan (2000)

A new class of fusion-associated small transmembrane (FAST) proteins encoded by the non-enveloped fusogenic reoviruses.

EMBO J. 19(5), 902-912.

Schragen, S. (2006)

Experimentelle Infektion von juvenilen *Boa constrictor* mit einem Orthoreovirusisolat.
Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

Schumacher, J. (1992)

Ätiologische und pathologische Untersuchungen über die sog. Einschlusskörperchen-
erkrankung der Riesenschlangen (Boidae).
Veterinärmedizinische Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.

Schumacher, J., E. R. Jacobson, B. L. Homer, J. M. Gaskin (1994)

Inclusion body disease in boid snakes.
Journal of Zoo Wildlife Medicine **25**, 511-524.

Schumacher, J., E. R. Jacobson, R. Burns, R. R. Tramontin (1994)

Adenovirus-like infektion in two rosy boas (*Lichanura trivirgata*).
Journal of Zoo Wildlife Medicine **25**, 461-465.

Tristem, M., E. Herniou, K. Summers, J. Cook (1996)

Three retroviral sequences in amphibians are distinct from those in mammals and birds.
Journal of Virology **70**, 4864-4870.

Tyler, K., B. N. Fields (1990a)

Reoviridae: A Brief Introduction. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Channock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.). *Virology*, second edition, Raven Press, Ltd., New York 45, 1271-1273.

Tyler, K., B. N. Fields (1990b)

Reoviruses. In: Fields, B. N., Knipe, D. M., Howley, P. M., Channock, R. M., Melnick, J. L., Monath, T. P., Roizman, B., Straus, S. E. (eds.). *Virology*, second edition, Raven Press, Ltd., New York 47, 1307-1328.

Varmus, H., und R. Swanstrom (1984)

Replication of retroviruses.
RNA Tumor Viruses, pp. 369-512.

Vieler, E., W. Baumgärtner, W. Herbst, G. Köhler (1994)

Characterization of a reovirus from a rattlesnake (*Crotalus viridis*) with neurological dysfunction.
Archives of Virology **138**, 341-344.

Wellehan, J. F. X., A. J. Johnson, B. Harrach, M. Benkö, A. P. Pessier, C. M. Johnson, M. M. Garner, A. Childress, E. R. Jacobson (2004)

Detection and analysis of six lizard adenoviruses by consensus primer PCR provides further evidence of a reptilian origin for the atadenoviruses.
Journal of Virology **78**, 13366-13369.

West, G., M. Garner, J. Raymond, K. S. Latimer, R. Nordhausen (2001)

Meningoencephalitis in a Boelen's Python (*Morelia boeleni*) associated with paramyxovirus infection,
Journal of Zoo Wildlife Medicine **32**, 360-365.

Withers-Ward, E. S., Y. Kitamura, J. P. Barnes und J. M. Coffin (1994)

Distribution of targets for avian retrovirus DNA integration in vivo.
Genes Dev. **8**, 1473-1487

Wood, G. W., R. A. J. Nickolas, C. N. Herbert, D. H. Thornton (1980)

Serological comparisons of avian reoviruses.
Journal of Comparative Pathology **90**, 29-38.

Wozniak, E., D. DeNardo, A. Brewer, V. Wong, R. Tarara (2000)

Identification of adenovirus- and dependovirus-like agents in an outbreak of fatal gastroenteritis in captive born California Mountain Kingsnakes, *Lampropeltis zonata multicincta*.
Journal of Herpetological Medicine and Surgery **10**, 4-7.

Wozniak, E., J. McBride, D. DeNardo, R. Tarara, V. Wong, B. Osburn (2004)

Isolation and characterization of an antigenically distinct 68-kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in *Boa constrictors* chronically infected with the inclusion body disease virus (IBDV: Retroviridae).
Veterinary Pathology **37**, 449-459.

Zeigel, R. F., H.F. Clark (1969)

Electron microscopic observations on a „C“-type virus in cell cultures derived from a tumor-bearing viper.
Journal of the National Cancer Institute **43**, 1099-1102.

Zschesche, W., A. Konstatinov, R. Ippen, Z. Mladenov (1988)

Lymphoid leukemia with presence of type C virus particles in a four-lined chicken snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*).
Verhandlungsberichte des Internationalen Symposiums über Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere **30**, 275-277.

Zwart, P., U. Hetzel, K. J. Dik (2001)

Osteitis deformans and concomitant inclusion body disease in a boa (*Boa constrictor*).
Meeting of EAZW, 24.-27.05.2001 Rotterdam.

Zwart, P. (1995)

Schlangen/Echsen. In: Gabrich, G., Zwart, P. Krankheiten der Heimtiere.
Schlütersche Verlagsanstalt, Hannover, S. 287-334.

9 Anhang

Table 18: Ergebnisse der Schlangen, die in wenigstens einer Untersuchung positiv waren

Identität (Land- Datum-Nr.- Probe)	Reptilienart Deutscher Name (Lateinischer Name)	Färbungen / Fluoreszenz				Passagen VH2-Zellkultur mit BME 2% 27°C, 5% CO ₂	Antikörper gegen		PCR	Klinik/ Pathologie	
		Pappenheim Färbung	HE-Färbung	Fluoreszenz HE-Färbung	Fluoreszenz native		VNT	HAH			
CR28032001 1A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	I.	Reovirus 26/00	<2	-	-	Nasenöffnung en verlegt
		-	-	-	-	II.	Adenovirus 27/00	<2	+	+	
		-	-	-	-	III.	PMV- 5688/91	<2	-	-	
CR28032001 2A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	I.	Reovirus 26/00	<2	-	-	obB.
		-	-	-	-	II.	Adenovirus 27/00	<2	+	+	
		-	-	-	-	III.	PMV- 5688/91	<2	-	-	
CR28032001 3A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	I.	Reovirus 26/00	<2	-	-	obB.
		-	-	-	-	II.	Adenovirus 27/00	<2	+	+	
		-	-	-	-	III.	PMV- 5688/91	<2	-	-	

D13022002 16A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
D13022002 17A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	1:4	<2	I II III	+ - +	-	obB.
D13022002 18A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	1:128	<2	I II III	+ +		obB.
D13022002 20A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2			I II III	+ +		obB.
D13022002 21A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	++ +	-	-	-	-	-	-	-	<2			I II III			obB.
D13022002 22A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2			I II III	+ +		obB.
D13022002 23A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	?	-	-	-	-	-	-	-	<2			I II III	+ +	-	obB.
D13022002 24A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2			I II III	+ +	-	obB.
D13022002 25A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	++	-	-	-	-	-	-	-	<2			I II III	- - +	- -	obB.

D13022002 26A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+?	-	-	-	-	-	-	-	<2			I II III	+ ?		obB.
D 27 - 44A D 27 - 44B	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	<2				I II III			obB.
D08032002 45A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	++ +	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2		I II III	+ +		obB.
D08032002 46A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	++ +	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2		I II III	+ +		obB.
D08032002 48A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	++ +	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2		I II III			obB.
D08032002 49A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	++ +	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2		I II III	+ +		obB.
D08032002 50A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	++ +	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2		I II III			obB.
D08032002 RB1A	Regenbogenboa (<i>Epicrates cenchria</i>)	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2		I II III	- - +		obB.
D08032002 RB2A	Regenbogenboa (<i>Epicrates cenchria</i>)	-	-	-	-	-	-	-					I II III			obB.

D09072002 64A D10102002 64B	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	Blut	-	-	-	<2	<2	I II III	+	-	obB.
D09072002 65A D10102002 65B	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	Blut	-	-	-	<2	<2	I II III	+	+	obB.
D09072002 66A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	Blut	-	-	<2	n.b. 1:16	I II III	+		obB.	
D09072002 67A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-	Blut	-	-	<2		I II III			obB.	
D09072002 68A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-						I II III			obB.	
D09072002 69A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-						I II III			obB.	
D09072002 70A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-	Blut	-	-	<2	<2	I II III			obB.	
D09072002 71A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	-	-	-	-	-	-	Blut	-	-	<2	<2	I II III			obB.	
D09072002 72A D10102002 72B	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	Blut	-	-	<2	1:32 1:64	I II	+	+	obB.	

D14122002 90A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III					obB.
D14122002 91A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III					obB.
103A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	n.b.	<2	+ +	obB.
104A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	<2	+ +	obB.	
106A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	1:64	<2		obB.
107A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	1:8	<2		obB.
109A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	<2	+ +	obB.	
110A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	<2	+ +	obB.	
112A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	<2	+ +	obB.	
113A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I II III	<2	1:32	<2		obB.

115A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	? ? +	obB.
116A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	obB.
117A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	? +	obB.
118A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	? ? +	obB.
121A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	obB.
122A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	obB.
123A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	obB.
125A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	obB.
126A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	obB.
127A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	obB.

128A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
129A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	-	obB.
131A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	? +		obB.
132A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
133A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
134A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +	-	obB.
135A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
136A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
137A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
139A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	1:64	<2	I II III	+ +	-	obB.

141A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+ +		obB.
142A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
143A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III		-	obB.
144A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
145A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III		- -	obB.
147A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	1:2	<2	I II III	+		obB.
148A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+	-	obB.
151A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
152A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
153A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+	-	obB.

154A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
155A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+	-	obB.
156A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+	+	obB.
157A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
158A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	1:32	<2	I II III			obB.
160A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
161A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	?	+	obB.
168A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+	+	obB.
169A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
D16022003 171A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III			obB.

D16022003 181A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	+	-	-	-	-	<2	1:4	<2	I II III			obB.
D16022003 182A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III			obB.
D16022003 183A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	+	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+	+	obB.
D16022003 184A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	+	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III			obB.
D16022003 185A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
D16022003 186A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-	<2	<2	<2	I II III	+		obB.
D 202A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	-	-	-	-	-				I II III			obB.
D 203A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	+	-	-	-	-	-	-				I II III			obB.
D Monty 2A	Boa Constrictor (<i>Boa constrictor</i>)	-	-	-	-	-	-	-				I II III	+	+	obB.
D Posch 3A	Boa Constrictor	-	-	-	-	-	-	-				I		-	obB.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. E. F. Kaleta möchte ich für die Überlassung des Themas sowie für seine fachlichen Ratschläge und für seine Unterstützung bei der Anfertigung des Manuskripts freundlich danken.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Böhm, Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, für seine fachliche und freundliche Unterstützung sowie für die Bereitstellung eines gut ausgestatteten Arbeitsplatzes.

Frau Dr. Renate Keil, die dieses Thema erst möglich gemacht hat, danke ich ebenfalls.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. Rachel E. Marschang, Institut für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim, für die wissenschaftliche Betreuung und die kritische Auseinandersetzung mit dem Manuskript. Ihre konstruktiven Anregungen haben entscheidend zu dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim für die fachliche Unterstützung, besonders Frau Dr. „Iki“ Hahn und den Mitarbeitern des Instituts für Veterinär-Pathologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die fachliche Unterstützung, besonders auch Herrn Dr. Udo Hetzel.

Ich danke besonders allen MitarbeiterInnen und DoktorandInnen des Institutes für Umwelt- und Tierhygiene der Universität Hohenheim für das kollegiale und nette Arbeitsklima.

Nicht zuletzt möchte ich mich an dieser Stelle bei allen anderen, im Besonderen meiner Frau Liana für ihre Unterstützung herzlich bedanken.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

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

ISBN 3-8359-5415-6



9 783835 195415



Coverbild: Tigerpython (*Python molurus*)

© Jonald John Morales - Fotolia.com