

**Isolierung und Charakterisierung eines zytopathogenen  
Picornavirus aus verschiedenen Landschildkrötenspezies  
im Zusammenhang mit juveniler Panzererweichung**

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

WENKE HEUSER





## **Bibliografische Informationen der Deutschen Bibliothek**

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

1. Auflage 2012

© 2012 by Verlag: **Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**,  
Gießen  
Printed in Germany

ISBN 978-3-86345-076-2

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

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

**Isolierung und Charakterisierung eines zytopathogenen  
Picornavirus aus verschiedenen Landschildkrötenspezies  
im Zusammenhang mit juveniler Panzererweichung**

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

eingereicht von  
WENKE HEUSER  
Tierärztin aus Darmstadt  
Gießen, 2012

Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus- Liebig-  
Universität Gießen.

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. M. Kramer

Gutachter:  
Prof. Dr. Dr. h.c. E.-F. Kaleta  
Prof. Dr. H.-J. Thiel

Tag der Disputation: 20.04.2012

Diese Arbeit widme ich  
meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Tochter Lilli

---

Aus Teilen dieser Dissertation entstanden folgende Abstracts von Tagungen

HEUSER, W., KEIL, G., HERBST, W. und KALETA, E. F. (2009):

Virus X als mögliche Ursache der juvenilen Panzererweichung. Isolierung und Charakterisierung.

1. DVG-Tagung über Vogel und Reptilienkrankheiten

25-27.09.2009, Leipzig.

HEUSER, W., KALETA, E. F., GIESOW, K., KEIL, G. und KNOWLES, N. (2010):

Genome sequence of virus X, a picornavirus isolated from a spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*).

EUROPIC: 11.-16.09.2010 St. Andrews, Scotland, GB. S. 147

**Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b>	<b>3</b>
2.1	Zur Anatomie des Panzers von Landschildkröten	3
2.2	Knochenstoffwechsel von Reptilien	6
2.2.1	Stoffwechselmetabolit Kalzium	6
2.2.2	Stoffwechselmetabolit Phosphat	7
2.2.3	Hormonelle Regulierung durch Kalzitinin	7
2.2.4	Hormonelle Regulierung mittels Parathormon	8
2.2.5	Stoffwechselmetabolit Vitamin D <sub>3</sub>	8
2.3	Metabolische Stoffwechselstörungen ( <i>Metabolic Bone Disease</i> ) als Ursache für Panzererweichung	9
2.3.1	Krankheitsbild der Rachitis	10
2.3.2	Krankheitsbild der Osteomalazie	11
2.5	Panzererweichung als Folge von Infektionen mit Parasiten	11
2.6	Panzererweichung als Folge bakterieller Infektionen	12
2.7	Mykotische Infektionen als Ursache für eine Panzererweichung	12
2.8	Erkrankungen des Panzers als Folge viraler Infektionen	13
2.8.1	Familie Herpesviridae	13
2.8.2	Familie Iridoviridae	16

2.8.3	Familie Reoviridae	18
2.8.4	Familie Paramyxoviridae	19
2.8.5	Familie Picornaviridae	20
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
3.1	Material	23
3.1.1	Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien	23
3.1.2	Eingesetzte Zellkulturlinien	24
3.1.3	Eingesetztes Kontrollvirus	25
3.1.4	Weitere Materialien und Geräte	25
3.1.5	Untersuchte Landschildkröten	25
3.1.6	Untersuchte Tupferproben von Landschildkröten	26
3.1.7	Blutserumproben für die Virusneutralisations-Tests	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Klinische Untersuchungen	27
3.2.2	Parasitologische Untersuchungen	27
3.2.3	Pathologisch-anatomische Untersuchungen	28
3.2.4	Bakteriologische und mykologische Untersuchungen	29
3.2.5	Pathohistologische Untersuchungen	29
3.2.6	Kultivierung und Subkultivierung von Zellkulturen	29
3.2.6.1	Probenaufbereitung und Virusisolierung	30
3.2.7	Virustitrationen	30

3.2.8	Untersuchungen zur Identifizierung der Isolate	31
3.2.8.1	Chloroformbehandlung der Isolate	31
3.2.8.2	Kultivierung der Isolate mit 5-Iodo-2'-Desoxyribonukleinsäure (IUDR)	32
3.2.8.3	Empfindlichkeit der Isolate gegenüber Aktinomycin D	32
3.2.8.4	Prüfung der pH-Stabilität ausgewählter Isolate mit Hilfe des <i>Mellvaine Buffers</i>	33
3.2.8.5	Vermehrung der Isolate in verschiedenen Zelllinien	34
3.2.9	Elektronenmikroskopische Untersuchung	34
3.2.10	Virusneutralisations-Tests	34
3.2.11	Sequenzierung	35
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
4.1	Klinische Befunde der untersuchten Landschildkröten	36
4.2	Parasitologische Befunde	36
4.3	Pathologisch-anatomische Veränderungen	36
4.4	Histopathologische Befunde	37
4.5	Bakteriologische und mykologische Untersuchungen der Organproben	40
4.6	Untersuchung der Organproben auf Virusgehalt mittels TH-1-Zellkulturen	40

4.6.1	Untersuchung der Tupferproben auf Virusgehalt mittels TH-1-Zellkulturen	42
4.6.2	Quantitative Bestimmung des Virusgehaltes mittels Titration der gefundenen Isolate	44
4.6.3	Versuche zur Virusisolierung aus Organproben in weiteren Zellkulturen	46
4.7	Behandlung mit Chloroform und Kultivierung mit IUDR	46
4.8	Einfluss von Aktinomycin D auf die Virusvermehrung	47
4.9	Prüfung der pH-Stabilität	48
4.10	Elektronenmikroskopische Untersuchung	48
4.11	Virusneutralisations-Tests	49
4.12	Sequenzierung des Genoms des Isolats mit der Tagebuchnummer 1243/37 Zu	51
4.12.1	Genomorganisation des Isolates 1243/37 Zu	51
4.12.2	Vergleich der Aminosäuresequenzen des Isolates 1243/37 Zu mit denen anderer Picornaviren	52
4.12.3	Einordnung des sequenzierten Isolates 1243/37 Zu in den phylogenetischen Stammbaum mittels Midpoint-rooted Neighbor-joining Methode	5351
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>63</b>

<b>7</b>	<b>Summary</b>	<b>65</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b>Anhang</b>	<b>82</b>

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tabelle 1:</b> Insgesamt untersuchte Landschildkröten	26
<b>Tabelle 2:</b> Tierart und Anzahl der gewonnenen Blutserumproben	27
<b>Tabelle 3:</b> Organe der 8 seziierten juvenilen Landschildkröten für die Virusisolierung und mikrobiologischen Untersuchungen	28
<b>Tabelle 4:</b> Infektionstiter der 64 untersuchten Organproben in TH-1 Zellkultur	41
<b>Tabelle 5:</b> Häufigkeit der Virusisolierung mit Bezug zum Ort der Tupferprobenentnahme von 9 Spezies der Landschildkröten	45
<b>Tabelle 6:</b> Ergebnisse der Titrationsen von 77 Tupferproben aus Konjunktiva, Rachen und Kloake aller Schildkröten	46
<b>Tabelle 7:</b> Infektionstiter nach Chloroform-Behandlung und nach Kultivierung mit IUDR im Vergleich zur Kontrolle	47
<b>Tabelle 8:</b> Titer in TH-1-Zellkultur nach Zugabe von Aktinomycin D	47
<b>Tabelle 9:</b> Prüfung der pH-Stabilität ausgewählter Isolate	48
<b>Tabelle 10:</b> Im Virusneutralisationstest mit Isolat 1243/37 Zu bestimmte Antikörper in Blutserumproben	50
<b>Tabelle 11:</b> Untersuchte Spezies und Art der Tupferproben	82
<b>Tabelle 12:</b> Virusisolierung aus den Tupferproben in TH-1	84
<b>Tabelle 13:</b> Infektiositätstiter der untersuchten Tupferproben in TH-1-Zellkultur	86

**Abbildungsverzeichnis**

<b>Abbildung 1:</b> Knochenplatten des Carapax von Landschildkröten	4
<b>Abbildung 2:</b> Hornplatten des Carapax von Landschildkröten	5
<b>Abbildung 3:</b> Knochenplatten des Plastrons bei Landschildkröten	5
<b>Abbildung 4:</b> Hornplatten des Plastrons von Landschildkröten	6
<b>Abbildung 5:</b> Schnitt durch den Röhrenknochen einer juvenilen <i>Testudo graeca</i> (H&E-Färbung)	39
<b>Abbildung 6:</b> Niere von juveniler <i>Testudo graeca</i> (H&E-Färbung)	40
<b>Abbildung 7:</b> TH-1-Zellkultur nicht infiziert; Nativpräparat (100-fache Vergrößerung)	43
<b>Abbildung 8:</b> TH-1-Zellkultur drei Tage p.i. mit Isolat 402/Ni, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung	43
<b>Abbildung 9:</b> Elektronenmikroskopische Darstellung von Picornavirus-ähnlichen Partikeln (Pfeile) nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure	49
<b>Abbildung 10:</b> Genomorganisation des sequenzierten Isolates Tgb-Nr. 1243/37 Zu	51
<b>Abbildung 11:</b> Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des Isolats 1243/37 Zu mit anderen Picornaviren	52
<b>Abbildung 12:</b> Vergleich und Einordnung des Isolates 1243/37 Zu anhand des P1 Kapsids mit Hilfe der midpoint-rooted Neighbor-joining Methode in den phylogenetischen Stammbaum.	54
<b>Abbildung 13:</b> Vergleich des Isolates 1243/37 Zu anhand der 3-D Polymerase mit Hilfe der midpoint-rooted neighbor-joining Methode und Einordnung in den phylogenetischen Stammbaum.	55

**Abkürzungsverzeichnis**

<b>A</b>	Auge
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Agr.</b>	Agrionemys
<b>A. dest.</b>	Aqua destillata
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BME</b>	Basal Medium Eagle's
<b>Da</b>	Darm
<b>DHCC</b>	Dihydroxycholcalciferol
<b>DPB</b>	Dulbecco's Phosphate Buffer
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EK</b>	Einschlusskörperchen
<b>EM</b>	Elektronenmikroskop
<b>et al.</b>	et alteri oder et alii (und andere)
<b>FKS</b>	fötales Kälberserum
<b>G</b>	Geochelone
<b>g</b>	Gramm
<b>Ge</b>	Gehirn
<b>H&amp;E</b>	Hämatoxylin-Eosin
<b>He</b>	Herz
<b>HEF</b>	Hühnerembryofibroblasten
<b>HELZ</b>	Hühnerembryoleberzellen
<b>IRES</b>	internal ribosomal entry site
<b>IUDR</b>	5-Iodo-2'-Desoxyuridin
<b>KID<sub>50</sub></b>	Kulturinfektiöse Dosis 50 %
<b>KI</b>	Kloake
<b>Le</b>	Leber
<b>m</b>	männlich
<b>MDBK</b>	Madin Darby Bovine Kidney cells
<b>mg</b>	Milligramm
<b>Mi</b>	Milz

<b>min</b>	Minute
<b>mm</b>	Millimeter
<b>mRNS</b>	messenger RNS
<b>neg.</b>	negativ
<b>Ni</b>	Niere
<b>nm</b>	Nanometer
<b>PAS</b>	Periodsäure-Schiff-Reaktion
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>pos.</b>	positiv
<b>p.i.</b>	post infectionem
<b>Ra</b>	Rachen
<b>RNS</b>	Ribonukleinsäure
<b>Test.</b>	Testudo
<b>TH-1</b>	terrapene heart cells
<b>THV-1</b>	Tortoise herpesvirus 1
<b>THV-2</b>	Tortoise herpesvirus 2
<b>TV</b>	Trypsin Versen
<b>UTR</b>	untranslated terminal region
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>VH2</b>	Russell's viper heart cells
<b>VNT</b>	Virusneutralisations-Test
<b>VP</b>	Virusprotein
<b>w</b>	weiblich
<b>ZPE</b>	zytopathischer Effekt
<b>Zu</b>	Zunge

**Verzeichnis der untersuchten Landschildkröten**

<b>Agronemys<sup>1</sup> horsfieldii</b>	Vierzehen-Landschildkröte
<b>Aldabrachelis gigantea</b>	Seychellen-Riesenschildkröte
<b>Astrochelys radiata</b>	Strahlenschildkröte
<b>Geochelone elegans</b>	Indische Sternschildkröte
<b>Geochelone sulcata</b>	Spornschildkröte
<b>Geochelone pardalis</b>	Pantherschildkröte
<b>Testudo carbonaria</b>	Köhlerschildkröte
<b>Testudo graeca ibera</b>	Maurische Landschildkröte
<b>Testudo graeca terrestris</b>	Maurische Landschildkröte
<b>Testudo hermanni boettgeri</b>	Griechische Landschildkröte
<b>Testudo marginata</b>	Breitrandschildkröte

-<sup>1</sup> andere Gattungsbezeichnung ist Testudo horsfieldii

## 1 Einleitung

Bei in Gefangenschaft gehaltenen Landschildkröten (*Testudinae*) kommt es durch Haltungs- und Fütterungsfehler häufig zu Stoffwechselstörungen. Diese manifestieren sich meist in Wachstumsstörungen des Panzers und/oder des gesamten Skelettsystems. Bei Jungtieren entwickelt sich häufig eine Rachitis, bei etwas älteren Tieren kann dies während des Wachstums zu einer *Osteodystrophia fibrosa* führen, welche sich klinisch in einer Höckerbildung des Panzers manifestiert (FRYE, 1973).

Ursachen hierfür sind meist mangelndes UV-Licht, vor allem ein Fehlen von UV-B-Strahlung, in einem Bereich von 290-320 nm und ein Kalziumdefizit kombiniert mit einem Phosphat-Überschuss in der Nahrung (BOYER, 1996; MADER, 2006). Ebenso wird ein Befall mit dem Darmparasiten *Hexamita parva* als mögliche Ursache diskutiert, da diese Protozoen zu einer Nierenschädigung und zu Störungen im Kalziumstoffwechsel führen können (SCHNELLER und PANTCHEV, 2008).

In den letzten Jahren berichteten Schildkrötenzüchter über eine erhöhte Jungtiersterblichkeit mit ungeklärter Ätiologie. Die Jungtiere sind nach dem Schlupf zunächst unauffällig. Sie haben einen physiologisch derb-elastischen Panzer. Im Alter von 6-8 Wochen kommt es zu einer massiven, spürbaren Erweichung des gesamten Panzers. Die betroffenen Tiere stellen die Nahrungsaufnahme ein, viele sterben schon etwa 10 - 14 Tage nach Auftreten der Symptome. Es gibt jedoch auch einzelne Exemplare, die noch bis zu einem Jahr mit einem weichen Panzer leben und erst dann sterben. Die Verluste können nahezu 100 % der Tiere aus einem Gelege betreffen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Bestand ausgewählt, der zum Zeitpunkt der Untersuchungen seit zwei Jahren erhebliche Probleme bei juvenilen Landschildkröten mit dem klinischen Bild einer Panzererweichung hatte. Die Mortalität bei den erkrankten Tieren war sehr hoch. Hiervon waren vor allem Maurische Landschildkröten (*Testudo graeca*) und indische Sternschildkröten (*Geochelone elegans*) betroffen. In diesem Bestand werden außer den beiden genannten Arten noch die Griechische Landschildkröte (*Testudo hermanni boettgeri*), die Breitrandschildkröte (*Testudo marginata*), die Vierzehn-

Landschildkröte (*Testudo horsfieldii*), die Pantherschildkröte (*Geochelone pardalis*), die Strahlenschildkröte (*Astrochelys radiata*), die Spornschildkröte (*Geochelone sulcata*), die Köhlerschildkröte (*Geochelone carbonaria*) und die Seychellen-Riesenschildkröte (*Aldabrachelis gigantea*) gehalten. Die Jungtiere dieser acht anderen Spezies waren nicht erkrankt. Gestorbene oder euthanasierte Jungtiere der beiden Spezies Maurische Landschildkröten (*Testudo graeca*) und Indische Sternschildkröten (*Geochelone elegans*) sowie Tupfer- und Blutproben von adulten Tieren wurden von mir untersucht. Die durchgeführten Untersuchungen an gestorbenen/euthanasierten Jungtieren umfassten die klinischen, pathologisch-anatomischen und histologischen sowie die bakteriologischen, mykologischen und virologischen Untersuchungen. Bei den adulten Tieren wurde zunächst eine allgemeine klinische Untersuchung durchgeführt. Die danach gewonnenen Tupferproben wurden virologisch untersucht. Es konnten von einigen Tieren Blutproben gewonnen und serologisch untersucht werden. Im Rahmen der virologischen Untersuchung konnte aus allen seziierten Jungtieren und aus Tupferproben der adulten Landschildkröten ein zytopathogenes Agens in Zellkulturen isoliert werden. Dieses Agens zeigte starke Ähnlichkeiten zum von MARSCHANG (2000) isolierten und beschriebenen „Virus X“. Allerdings hat MARSCHANG (2000) diese zytopathogenen Agenzien im Zusammenhang mit dem Rhinitis-Stomatitis-Komplex der Landschildkröten beschrieben. Sie isolierte das Virus aus Tupferproben und Organen von adulten Landschildkröten.

Ziele der eigenen Arbeiten sind weitere Versuche zur Virusisolierung aus erkrankten juvenilen Landschildkröten mit weichem Panzer und eine weiterführende Charakterisierung des isolierten zytopathogenen Agens. Ein weiteres Ziel bezieht sich auf Antikörpernachweise im Blut rekonvaleszenter Landschildkröten.

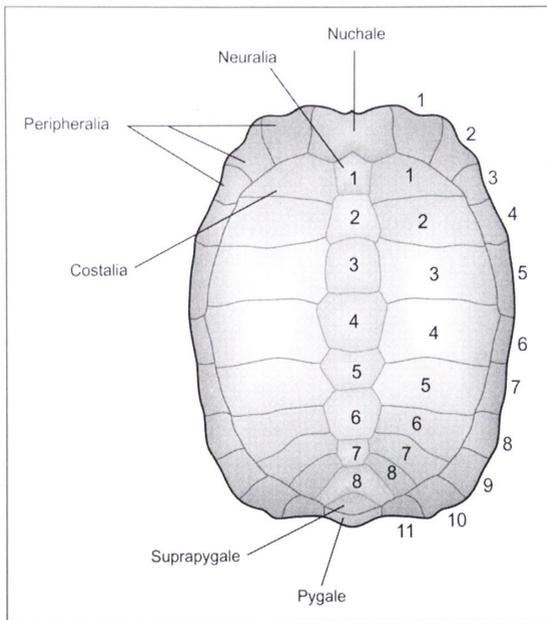
## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Zur Anatomie des Panzers von Landschildkröten

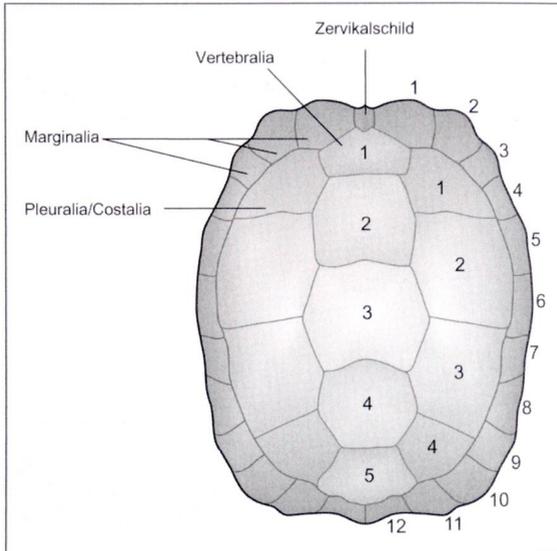
Der Panzer von Landschildkröten besteht aus dem Rücken- (Karapax) und dem Bauchpanzer (Plastron), beide sind über die sogenannte Brücke miteinander verbunden. Die knöchernen Strukturen des Panzers bestehen aus etwa 60 umgebildeten Hautknochen. Diese werden aus den Rumpfwirbeln, dem Sakrum und den Rippen gebildet. Die zehn Rumpfwirbel und die davon ausgehenden Rippen verschmelzen jeweils mit den Hautknochen. Bei Landschildkröten der Gattung *Testudo* sind die Wirbel jedoch sehr leicht und die Rippenenden sehr dünn, so dass man sie makroskopisch kaum erkennen kann (ZANGERL, 1969; O'MALLEY, 2005; POUGH et al., 1998). Als anatomische Besonderheit der Schildkröten (Chelonia) ist noch zu erwähnen, dass der Schulter- sowie der Beckengürtel innerhalb der Rippen liegen. Sie stellen vertikale Säulen dar und ermöglichen so eine zusätzliche Stabilität des Panzers. Der Schultergürtel besteht aus dem Epiplastron (Klavikula), dem Entoplastron (Interklavikula) und einer dreigeteilten Anordnung von Skapula, Akromion und Korakoid. Der Schultergürtel ist über ligamentartige Verbindungen mit dem Karapax und über bindegewebige Bänder mit dem Plastron verbunden. Der Beckengürtel besteht aus dem Os ilium, Os ischium und Os pubis. Das Ilium ist dorsal mit den sakralen Rippen verbunden. Die Wirbelschilder, welche die Knochenplatten (Abbildung 1) bedecken und die über das Periost und die Lederhaut mit den darunter liegenden Knochennähten verbunden sind, stimmen in ihrer Zahl und Lage nicht mit den Knochenplatten überein (DÄMMRICH, 1967). Sie sind als Äquivalent zu den Schuppen anderer Reptilien anzusehen und sind epidermalen Ursprungs. Alle Landschildkröten besitzen zentral fünf unpaare Wirbelschilder, die sogenannten Vertebralia. Diese bedecken die Wirbelkörper (Neuralia). Die Vertebralia werden seitlich von vier Rippenschildern, den Costalia, begrenzt (Abbildung 2). Die kleinen Randschilder bezeichnet man als Marginalia. Geierschildkröten (*Macrochelys temminckii*) besitzen zudem noch Supramarginalschilder zwischen den Rippen- und Randschildern. Am Kopfende befindet sich ein unpaares Nackenschild (Nuchale) und über dem Schwanz ein großes, manchmal je nach Art, auch zweigeteiltes Schwanzschild (Pygale) (RATHKE, 1848).

Die Bauchschilder, auch als Abdominalia bezeichnet, sind in 6 Paaren angeordnet. Sie werden je nach bedecktem Körperbereich als Kehlschilder (Gularia), Armschilder (Humeralia), Brustschilder (Pectoralia), Bauchschilder (Abdominalia) und Schenkelschilder (Femoralia) sowie Afterschilder (Analia) bezeichnet. Die kleinen Brückenschilder im Bereich der Vordergliedmaßen werden als Axillaria, die an den Hintergliedmaßen als Inguinalia bezeichnet.

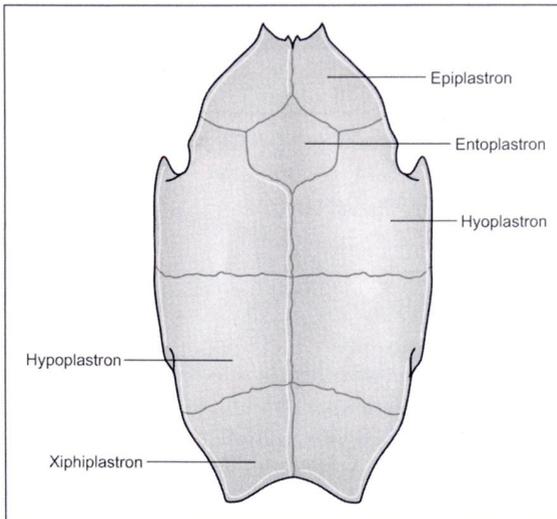
Die Abbildungen 1-4 zeigen schematisch die topographischen Unterschiede in Größe und Anzahl der Knochen- und Hornplatten bei Landschildkröten (O'MALLEY, 2005).



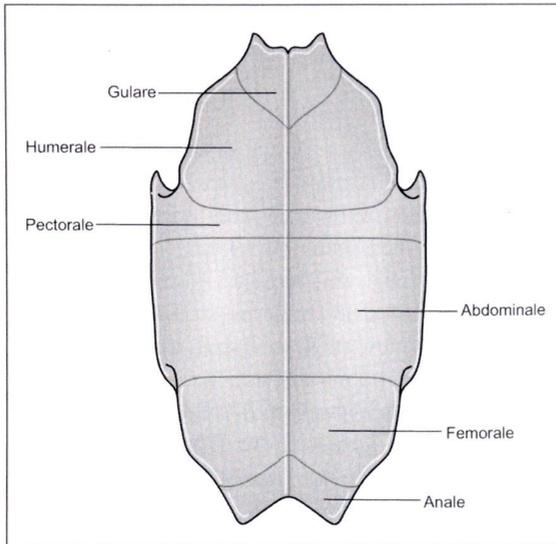
**Abbildung 1: Knochenplatten des Carapax von Landschildkröten**



**Abbildung 2: Hornplatten des Carapax von Landschildkröten**



**Abbildung 3: Knochenplatten des Plastrons bei Landschildkröten**



**Abbildung 4: Hornplatten des Plastrons von Landschildkröten**

## 2.2 Knochenstoffwechsel von Reptilien

Da auch Reptilien alle wichtigen Hormone und Organe besitzen, die beim Säugetier den Kalziumstoffwechsel regulieren, kann man davon ausgehen, dass auch bei Landschildkröten ein zumindest ähnlicher Kreislauf besteht (DACKE, 1979). Der Blut-Kalzium-Spiegel unterliegt aber bei Reptilien viel größeren Schwankungen als beim Säuger (DACKE, 1979). Diese Abweichungen ergeben sich aus jahreszeitlichen Anpassungen einschließlich Winterruhe und der Legetätigkeit.

### 2.2.1 Stoffwechselmetabolit Kalzium

Kalzium spielt auch bei Landschildkröten eine wichtige Rolle bei allen lebenswichtigen Stoffwechselvorgängen. Es wird für eine normale neuromuskuläre Funktion, für Enzymaktivität, Membranpermeabilität, Blutbildung und für ein stabiles Skelett benötigt (FOWLER, 1986; BOYER, 1996).

Den größten Anteil mineralischer Elemente machen mit etwa 70 % Kalzium und Phosphat aus.

99 % des Körperkalziums werden in Knochen gespeichert. Kalziumsalze haben im Knochen eine Stützfunktion, vor allem als Apatitminerale wie Hydroxylapatit und Carbonatapatit. Es wird im Knochen etwa die doppelte Menge Kalzium im Verhältnis zu Phosphat gespeichert (DENNERT, 1999).

Das benötigte Kalzium wird mit der Nahrung aufgenommen. Für die Kalziumabsorption durch die Epithelzellen des Duodenums wird Vitamin D<sub>3</sub> benötigt (FOWLER, 1986). Im Blut ist Kalzium etwa zur Hälfte als frei diffundierendes Ion vorhanden, dies ist die physiologisch aktive Form, der Rest ist an Blutplasma-proteine gebunden (FOWLER, 1986). Oxalat und Phytin aus der Nahrung hemmen die Kalziumresorption, da sie mit freiem Kalzium Komplexe bilden, so dass das Kalzium dem Körper nicht zur Verfügung steht (GÜNTHER, 1969).

### **2.2.2 Stoffwechselmetabolit Phosphat**

Phosphatverbindungen sind Bestandteile der Desoxyribonukleinsäure (DNS) und der Ribonukleinsäure (RNS). Die phosphathaltige Verbindung Adenosin-Triphosphat (ATP) dient als Energieträger der Zelle.

Etwa 85 % des Phosphats wird im Knochen gespeichert (DENNERT, 1999).

Phosphat ist zusammen mit Kalzium als Hydroxylapatit ein Hauptbestandteil der Knochengerüstsubstanz.

### **2.2.3 Hormonelle Regulierung durch Kalzitinin**

Die Phosphatkonzentration wird ebenso wie die Kalziumkonzentration durch Kalzitinin und Parathormon reguliert. Kalzitinin wird auch bei Reptilien in der Ultimobranchialdrüse gebildet. Diese liegt zusammen mit der Schilddrüse und der Nebenschilddrüse an der Bifurkation der rechten Aorta (CLARK, 1971). Die Ultimobranchialdrüse ist makroskopisch nicht von der Schilddrüse zu differenzieren (FRYE, 1991). Sie ist in ihrem Aufbau und ihrer Funktion der Ultimobranchialdrüse der Vögel und Säugetiere sehr ähnlich (CLARK, 1971). Bei einem zu hohen Blutkalziumspiegel wird vermehrt Kalzitinin aus der Ultimobranchialdrüse sezerniert, dies führt zu einer verminderten Osteolyse und zu einem vermehrten Kalziumeinbau in die Knochen. Kalzitinin ist hierbei ein Parathormonantagonist. Eine vermehrte Sekretion von Kalzitinin findet direkt nach der Nahrungsaufnahme statt, so dass mit der Nahrung aufgenommenes

Kalzium möglichst schnell in die Knochen eingelagert werden kann. Bei Säugetieren kommt es nach der Nahrungsaufnahme zu einer Verlangsamung des Verdauungsvorgangs, um eine zeitlich gleichmäßige Verteilung der Kalziumaufnahme zu gewährleisten, damit es nicht zu einem massiven Anstieg der Blutkalziumkonzentration kommt und damit zu einer Hemmung des Parathormons. Wird die Parathormonsekretion gehemmt, wird der Kalziumkonservierende Faktor an der Niere aufgehoben, so dass Kalzium direkt wieder über die Nieren ausgeschieden wird. Ob dieser Vorgang bei Reptilien eine Rolle spielt, ist noch unklar, da die Verdauung bei Reptilien stark von exogenen Faktoren abhängt, wie z. B. Jahreszeit, Umgebungstemperatur und allgemeine Kondition der Tiere.

#### **2.2.4 Hormonelle Regulierung mittels Parathormon**

Vermutlich laufen die Stoffwechselfvorgänge in der Parathyreoidea bei Reptilien ähnlich wie bei Säugetieren ab, so dass eine erniedrigte Blutkalziumkonzentration die Sezernierung von Parathormon stimuliert (CLARK, 1969). Das in der Nebenschilddrüse gebildete Parathormon wirkt am Knochen und aktiviert die Osteoklasten zum Knochenabbau. Dadurch werden Kalzium- und Phosphationen ins Blut freigesetzt (DAVIS, 1981). Die Bindung von Kalzium- und Phosphationen wird dadurch verhindert, dass das sezernierte Parathormon die Ausscheidung von Phosphat über die Niere fördert. Außerdem hemmt es in der Niere die Kalziumausscheidung, so dass Kalzium im Körper zurückgehalten wird. Eine weitere wichtige Funktion des Parathormons in der Niere ist die Stimulation eines Enzyms, welches das 25-Hydroxycholecalciferol in Position C-1 hydroxyliert. So entsteht das für die Kalziumresorption aus dem Intestinaltrakt wichtige 1,25-Dihydroxycholecalciferol (MADER, 2006).

#### **2.2.5 Stoffwechselmetabolit Vitamin D<sub>3</sub>**

Für eine Konstanterhaltung des Blutkalziumspiegels werden Vitamin D-Hormone benötigt. Bei pflanzenfressenden Reptilien wird über die Nahrung Ergocalciferol, das sogenannte Vitamin D<sub>2</sub>-Prohormon aufgenommen. Das Provitamin D<sub>2</sub> wird in der Schleimhaut von Magen und Darm durch eine Dehydrogenase in 7-

Dehydrocholesterin umgewandelt. Dies gelangt über den Blutweg in die Haut. Dort kommt es unter Einwirkung von UV-Strahlung in einem Wellenlängenbereich von 290 bis 320 nm zur Öffnung des B-Rings, so dass das 7-Dehydrocholesterol in Cholecalciferol umgewandelt wird (FOWLER, 1986; BOYER, 1996). Es handelt sich hierbei immer noch um ein Prohormon. Dieses wird durch ein Hormon-bindendes Protein in die Leber transportiert. Hier wird es in das Steroidhormon 25-Hydroxycholecalciferol (25-HCC) umgewandelt. In einem weiteren Syntheseschritt, der in den Nieren stattfindet, wird 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25-DHCC) gebildet, das für die Kalziumresorption wichtige VitaminD<sub>3</sub>-Hormon. Ohne die Synthese von 1,25-DHCC ist nur eine geringe Kalziumresorption aus dem Intestinaltrakt möglich (FOWLER, 1986; MADER, 2006). Ein ganz geringer Teil des Kalziums kann über Diffusion aus dem Darmlumen aufgenommen werden (FOWLER, 1986). In der Dünndarmmukosa wird von 1,25-DHCC ein Protein induziert, welches Kalzium bindet und damit die Konzentrierung und anschließende Diffusion des Kalziums ins Blut erleichtert. Ebenso wird unter Einwirkung des 1,25-DHCC eine kalziumabhängige ATPase gebildet, welche vermutlich für den aktiven Kalziumtransport aus dem Lumen in die Epithelzellen zuständig ist.

### **2.3 Metabolische Stoffwechselstörungen (*Metabolic Bone Disease*) als Ursache für die Panzererweichung**

*Metabolic Bone Disease* wird im Allgemeinen als Faktorenkrankheit angesehen, welche zu unterschiedlichen Störungen im Knochenstoffwechsel führen kann (FRYE, 1991; CALVERT, 2004; MADER, 2006).

Nach MADER (2006) unterscheidet man ätiologisch zwei Formen:

#### 1) Ernährungsbedingte *Metabolic Bone Disease*

Die ernährungsbedingte *Metabolic Bone Disease* entsteht durch fehlerhaftes Management in der Haltung und Ernährung von Reptilien. Häufige Ursachen sind dabei ein falsches Kalzium-Phosphor-Verhältnis in der Nahrung, Mangel an Vitamin D<sub>3</sub> und keine oder zu wenig UV-B-Strahlung. Dies alles führt zu einem erniedrigten Kalzium-Spiegel im Blut. Um den Blutkalziumspiegel zu erhöhen,

wird die Sekretion von Parathormon gesteigert. In Folge dessen wird die Osteoklastenaktivität gesteigert, und es kommt zu einer ständigen Kalziumfreisetzung aus den Knochen. Werden die Fehler in Haltung und Fütterung nicht behoben, führt dies durch die permanente Ausschüttung von Parathormon (PTH) zu einer Hypertrophie der Parathyreioidea. Gleichzeitig wird ständig Kalzium aus den Knochen freigesetzt, so dass diese dadurch an Stabilität verlieren (CALVERT, 2004; MADER, 2006).

## 2) Renal bedingte *Metabolic Bone Disease*

Bei der renal bedingten *Metabolic Bone Disease* kommt es durch eine Schädigung der Niere verschiedenster Ätiologie zu Einschränkungen in der 1,25-DHCC-Synthese und damit zu einer geringeren Kalziumaufnahme aus dem Futter. Nierenfunktionsstörungen führen außerdem zu einer Phosphatretention. Steigt der Blut-Phosphat-Spiegel über ein bestimmtes Niveau, wird eine forcierte Phosphatausscheidung durch PTH gefördert. Dies führt bei länger bestehenden Niereninsuffizienzen wieder zu einer Hypertrophie der Parathyreioidea. Die damit verbundene gesteigerten Osteoklastenaktivität führt zum Abbau von Knochenmaterial (CALVERT, 2004; MADER, 2006).

Die durch beide Ursachen hervorgerufenen Störungen im Knochenstoffwechsel mit verbundener Erweichung des Knochens und des Panzers bezeichnet man beim Jungtier als Rachitis und beim adulten als Osteomalazie (CALVERT, 2004; MADER, 2006).

### 2.3.1 *Krankheitsbild der Rachitis*

Als Rachitis bezeichnet man eine ungenügende Mineralisierung der Knochen des wachsenden Tieres, hervorgerufen durch einen Mangel an Vitamin D<sub>3</sub>, ungenügende UV-B-Strahlung, unzureichende Kalziumzufuhr und ein fehlerhaftes Kalzium-Phosphat-Verhältnis in der Nahrung (FRYE, 1973; BOYER, 1996). Bei Schildkröten sind vor allem Jungtiere herbivorer Arten betroffen (FRYE, 1991). Die Panzer solcher Tiere sind derart weich, dass sie auf leichten Druck des Fingers schon stark nachgeben. Man gewinnt den Eindruck, dass die Festigkeit nur noch durch die Hornplatten gegeben ist (HÄFELI und ZWART, 2000). Es kann

außer zu einer Panzererweichung auch zu einer Panzerverformung, wie z. B. Knicke in der Wirbelsäule oder Einsinken sowie Abflachen des Karapax kommen (FRYE, 1973).

### **2.3.2. Krankheitsbild der Osteomalazie**

Die Osteomalazie ist eine Knochenerweichung bei adulten Tieren. Die Gründe für einen Knochenabbau bei adulten Tieren können auch hier wieder Fehler in der Haltung und Fütterung sein, welche zu einem ernährungsbedingtem sekundären Hyperparathyreoidismus führen. Häufiger ist hier aber die Ursache in einem durch Störung der Nierenfunktion hervorgerufenen sekundären renalen Hyperparathyreoidismus zu finden. Auch hier kann es wieder zu Stabilitätsverlusten des Panzers und der Knochen kommen (MADER, 2006).

## **2.5 Panzererweichung als Folge von Infektionen mit Parasiten**

Bei einer Panzererweichung der Schildkröten spielen Parasiten, besonders Protozoen der Gattung *Hexamita*, eine Rolle. Die Spezies *Hexamita parva* ist normalerweise im Lumen des Intestinaltrakts anzutreffen. Es handelt sich hierbei um einen Flagellaten, welcher bei einer Länge von 8 µm relativ klein ist. Er ist sehr beweglich und verlässt unter dem Mikroskop schnell das Blickfeld.

*Hexamita parva* kann aus dem Darm über den Gallengang in die Leber sowie retrograd über die Kloake durch die Harnleiter in die Niere aufsteigen. Dort können Hexamiten entzündliche Veränderungen hervorrufen. In der Leber kann dies zu einer Dilatation der Gallengänge führen (ZWART, 1975). Bei einem Befall der Nieren kann es zu einer starken Vermehrung der Flagellaten kommen. Häufig führt dies zu einer Nephrose, die Nieren erscheinen dann vergrößert und aufgehellert. Bei einem chronischen Befall dilatieren die Nierentubuli, histologisch ist auch eine Schädigung der Glomeruli nachweisbar, wobei die stärksten Veränderungen in den distalen Abschnitten der Harnröhren auftreten (JACOBSEN, 1994). Bei einer Schädigung der Nieren scheiden diese Tiere flüssigen, teilweise gallertartigen und schleimigen Urin aus. Im frischen Nativausstrich vom Darm kann *Hexamita parva* an Hand von Größe, Form und lebhafter Beweglichkeit lichtmikroskopisch leicht nachgewiesen werden. Diese durch *Hexamita parva* bedingte Nephritis kann zu Störungen im Kalziumstoffwechsel führen. In den

geschädigten Nieren kann das inaktive Vitamin D<sub>3</sub> nicht in die aktive Form umgebaut werden, so dass nicht mehr genug Kalzium aus der Nahrung aufgenommen werden kann. Da der Organismus auf einen konstanten Blut-Kalzium-Spiegel angewiesen ist, wird Kalzium aus den Knochen freigesetzt. Dies führt langfristig zu einer Entmineralisierung der Knochen und zu einer Erweichung des Panzers (BECK und PANTCHEV, 2006; SCHNELLER und PANTCHEV, 2008).

## **2.6 Panzererweichung als Folge bakterieller Infektionen**

Bisher ist nicht bekannt, ob eine bakterielle Infektion des Panzers zu dessen Erweichung führen kann. Es können allerdings bakteriell bedingte Nephropathien entstehen (SASSENBERG und ZWART, 2005). Verursacher hierfür sind überwiegend gram-negative Bakterien, zum Beispiel *Pseudomonas* ssp., *Aeromonas* ssp., *Escherichia coli*, *Proteus* ssp. und *Citrobacter* ssp. (GÖBEL und SCHILDGER, 1990). Führt die Infektion zu einer schwerwiegenden Funktionsstörung der Nieren, kann auch in diesem Fall nicht die aktive Form des Vitamin D<sub>3</sub> gebildet werden. Die damit verbundene schlechte Kalziumresorption aus dem Darm kann zu einer Entmineralisierung des Panzers führen.

## **2.7 Mykotische Infektionen als Ursache für eine Panzererweichung**

Generell werden bei Landschildkröten Haut- bzw. Panzermykosen seltener als bei Wasserschildkröten diagnostiziert. Kommt es jedoch zu einer Panzermykose, hervorgerufen durch Schimmelpilze wie *Apergillus* ssp. und *Mucor* ssp., kann dies zu tiefgreifenden Läsionen führen. Oberflächliche Ulzerationen können leicht perforieren und tiefe Nekrosen mit Knochenbeteiligung verursachen. Dies kann im schlimmsten Fall zu einer massiven Zerstörung der Knochenmatrix des Panzers führen, so dass dieser an Stabilität verliert und es zu Frakturen kommt (HÄFELI und SCHILDGER, 1995).

## 2.8 Erkrankungen des Panzers als Folge viraler Infektionen

Es sind verschiedene virusbedingte Erkrankungen bei Landschildkröten bekannt, jedoch ist bislang keine mit dem Erscheinungsbild einer Panzererweichung beschrieben worden. Seit vielen Jahren spielt eine Infektion mit Herpesviren bei Landschildkröten eine große Rolle (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; MÜLLER et al., 1990; PETTAN-BREWER et al., 1996; WENKER et al., 1997; ORIGGI et al., 2002). Außerdem konnten Irido-, Reo-, Paramyxo- und Picorna-ähnliche Viren (Virus X) nachgewiesen werden (HELDSTAB und BESTETTI, 1982; OETTLER et al., 1990; ZANGER et al., 1991; MARSCHANG, 2000; UHLENBROCK, 2010).

### 2.8.1 Familie *Herpesviridae*

Bei Landschildkröten gehören Herpesviren zu den am häufigsten nachgewiesenen Viren, die zu schweren Erkrankungen mit Todesfolge führen können. Herpesviren sind 120-200 nm große behüllte, doppelsträngige DNS-Viren mit ikosaedrischem Nukleokapsid und mehrschichtiger Hülle. Zur Ordnung Herpesvirales gehören die Familien *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae* (Fisch und Froschviren) und die von zweischaligen Muscheln bekannten *Malacoherpesviridae* (DAVISON et al., 2009). Die Familie der Herpesviridae umfasst die Unterfamilien Alpha-, Beta- und Gammaherpesvirinae, die aus Säugern, Vögeln und Reptilien isoliert wurden.

Alle bisher aus Reptilien isolierten Herpesviren werden der Familie *Herpesviridae* zugeordnet, jedoch ist bisher kein Isolat aus Reptilien einer der drei Unterfamilien bzw. Genera zugeordnet worden (DAVISON et al., 2009). Die Replikation aller Herpesviren findet im Zellkern statt. Herpesvirusinfektionen führen immer zur Ausbildung von intranukleären Einschlüssen in Zellen der betroffenen Organe. Histologisch können diese eosinophilen, intranukleären Einschlüsse in fast allen Organen gefunden werden, am häufigsten im Epithel von Zunge, Maulschleimhaut, des oberen Respirationstrakts und des gesamten Intestinaltraktes (MCARTHUR et al., 2002).

Herpesviren können in Landschildkröten jeden Alters, unterschiedlicher geographischer Herkunft und verschiedener Arten angetroffen werden (VIX, 1997; MCARTHUR et al., 2002). Bei Landschildkröten äußern sich Herpesvirusinfektionen klinisch meist als Rhinitis, Stomatitis, Glossitis und Konjunktivitis.

Häufig bilden sich eitrig-diphtheroide Beläge auf der Zunge, wobei sich die Beläge bis in die Trachea und den Oesophagus ziehen können. Die Tiere sind in der Regel lethargisch und anorektisch (MÜLLER et al., 1990; MURO et al., 1998).

Haben die Tiere eine akute Herpesvirusinfektion überstanden, kann es zur Ausbildung zentralnervöser Störungen kommen, die aus Lähmungserscheinungen und Inkoordinationsstörungen bestehen (HELDSTAB und BESTETTI, 1989; WENKER, 1997). Im Zusammenhang mit isolierten Herpesviren wurde dieselbe Symptomatik bei Landschildkröten in den USA beschrieben (PETTAN-BREWER et al., 1996; ORIGGI et al., 2002). Die ersten Beschreibungen dieser typischen diphtheroiden Stomatitis erfolgten bereits von HOLT und COOPER (1976), die jedoch ein bakterielles Geschehen vermuteten. COOPER et al. (1988) fanden Herpesvirus-ähnliche Partikel bei einer Maurischen Landschildkröte mit Stomatitis. Lichtmikroskopisch konnten intranukleäre Einschlüsse und elektronenmikroskopisch konnten Herpesvirus-ähnliche Partikel bei verschiedenen Arten der Landschildkröten im Zusammenhang mit Stomatitis nachgewiesen werden (BRAUNE et al., 1989; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; LANGE et al., 1989; MÜLLER et al., 1990). HARPER et al. (1982) konnten aus einer gestorbenen Wüstenschildkröte (*Gopherus agassizii*) mit pharyngealem Abszess in der histologischen Untersuchung intranukleäre Einschlusskörperchen nachweisen sowie elektronenmikroskopisch Partikel finden, die der Morphologie nach Herpesviruspartikel sein könnten.

Die ersten Virusisolierungen mittels Zellkultur gelangen nahezu zeitgleich durch BIERMANN und BLAHAK (1993) sowie KABISCH und FROST (1994) in TE (*turtle embryo cells*). Am empfänglichsten für das Herpesvirus der Landschildkröten scheinen europäische Landschildkröten zu sein (COOPER et al., 1988; HELDSTAB und BESTETTI, 1989; LANGE et al., 1989; MÜLLER, 1990; BIERMANN, 1995; DRURY et al., 1998; MARSCHANG et al., 1998; MARSCHANG, 2000; UNE et al., 1999; STEINER, 2010). Jedoch sind auch unter den europäischen Arten unterschiedliche Empfänglichkeiten beschrieben worden. Zu den besonders empfänglichen Spezies zählen die Griechischen (*Testudo hermanni*), sowie die Vierzehen-Landschildkröten (*Agronemys horsfieldii*). Maurische Landschildkröten (*Testudo graeca*) und Breitrandchildkröten (*Testudo marginata*) scheinen

dagegen relativ widerstandsfähig gegenüber einer Infektion zu sein, sie entwickeln hohe Antikörpertiter und überleben recht häufig (BLAHAK, 2000). Neuere Untersuchungsergebnisse durch STEINER (2010) geben allerdings Hinweise darauf, dass auch die Vierzehen-Landschildkröten meist sehr hohe Titer entwickeln. Erste Nachweise von neutralisierenden Antikörpern im Serum von Schildkröten, die eine Herpesvirus-Infektion überstanden hatten, konnten von KABISCH und FROST (1994) beschrieben werden. Weiterhin haben serologische Untersuchungen ergeben, dass mindestens 2 Serotypen des Schildkröten-Herpesvirus 1 (THV-1) vorhanden sind (BIERMANN, 1995; MARSCHANG et al., 1997). Im Jahre 2005 gelang es JOHNSON et al. ein neues Schildkröten-Herpesvirus (THV-2) aus einer Californischen Wüstenschildkröte (*Gopherus agassizii*) zu isolieren und zu charakterisieren. Bei wildlebenden Griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*) in Frankreich konnten bisher noch keine Viren oder Antikörper nachgewiesen werden (MATHES, 2003). Jedoch zeigten Untersuchungen von MARSCHANG und SCHNEIDER (2002), dass in der Türkei wildlebende Maurische Landschildkröten über einen Antikörpertiter gegenüber Herpesviren (THV-1 und THV-2) verfügen können. Die unterschiedliche Empfänglichkeit gegenüber Herpesviren wurde auch schon bei einem gemischten Import von argentinischen Landschildkröten (*Geochelone chilensis*) und Köhlerschildkröten (*Geochelone carbonaria*) in den USA berichtet. Bei diesem Import starben alle argentinischen Landschildkröten, und die Köhlerschildkröten überlebten (JACOBSEN et al., 1985).

Die Diagnose einer Herpesvirusinfektion kann mittels verschiedener Nachweisverfahren am lebenden sowie toten Tier gestellt werden. Dies gelingt zum einen über einen direkten Nachweis mittels Zellkultur oder PCR, zum anderen indirekt über einen Antikörpernachweis im Serum. Beschrieben ist ebenso ein Nachweis von intranukleären Einschlüssen, die histologisch in Zungenabklatschpräparaten zu finden sind (MÜLLER et al., 1990). Dies ist jedoch eine sehr unsichere Methode. Ein direkter Nachweis von Herpesviren mittels Zellkultur (TH-1) erfolgt aus Tupfer- oder Organmaterial. Der Nachteil dieses Verfahrens ist die lange Zeitdauer. Mittlerweile sind 4 PCR-Protokolle zum Nachweis von Herpesviren bei Landschildkröten publiziert worden. Untersuchungen bezüglich deren

Sensitivität und Spezifität fanden durch TORNEDE (2006) statt. Sie verglich die PCR-Protokolle von VAN DEVANTER et al. (1996) mit denen von MURAKAMI et al. (2001) und TEIFKE et al. (2000). Es zeigte sich, dass die von VAN DEVANTER et al. (1996) entwickelte PCR die höhere Sensitivität aufweist. Diese Differenzen könnten durch die eingesetzten Consensus-Primer sowie durch das nested Format der PCR bedingt sein.

VAN DEVANTER et al. (1996) entwickelten eine PCR zum Nachweis von Schildkrötenherpesviren auf der Basis des DNS-Polymerase-Gens. Mit dieser PCR ist es möglich, eine Vielzahl verschiedener Spezies zu untersuchen, es werden degenerierte Primer im nested Format eingesetzt. Eine weitere PCR für den Nachweis von Herpesviren bei Landschildkröten basiert zum einen auf dem UL5 (DNA-helicase/primase verbundenem Protein-Gen) Homologon und zum anderen auf dem Homolog des ribonucleotide reductase Gens (UL 39) (ORIGGI et al., 2004). Neben der Virusisolierung und der Untersuchung mittels PCR besteht die Möglichkeit einer serologischen Untersuchung mittels Virusneutralisationstest (VNT) (KABISCH und FROST, 1994; BIERMANN, 1995; FROST und SCHMIDT, 1997; MARSCHANG et al., 1997). Jedoch ist auch dies keine sichere Untersuchungsmethode, um latent infizierte Tiere zu erkennen.

Therapeutisch sind bis jetzt nur Ansätze vorhanden. In der Literatur wird über mäßige Erfolge mittels Acyclovir® berichtet (COOPER et al., 1988; HÄFELI und SCHILDGER, 1995). Acyclovir® ist ein antiviraler Wirkstoff, der die DNS-Polymerase von Herpesviren hemmt (HIRSCH et al., 1996). *In vitro*-Untersuchungen von MARSCHANG et al. (1997) zeigten eine Hemmung der Virusvermehrung in infizierten Zellkulturen.

### **2.8.2 Familie Iridoviridae**

Iridoviren sind 120-300 nm große, doppelsträngige DNS-Viren mit ikosaedrischem Kapsid, welches eine Lipidkomponente beinhaltet. Die Familie *Iridoviridae* wird derzeit in 5 Genera unterteilt: *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus*, *Lymphocystivirus* und *Megalocytivirus*. Die Genera *Irido-* und *Chloriridovirus* sind bisher nur bei Invertebraten beschrieben. *Ranavirus*, *Lymphocytivirus* und *Megalocystivirus* werden bei ektothermen Wirbeltieren

gefunden (CHINCHAR et al., 2005). Iridoviren verursachen eine Reihe von verschiedenen Erkrankungen bei Amphibien, Fischen und vielen Invertebraten (HETRICK und HEDRICK, 1993; WILLIAMS, 1996; MAO et al., 1997; WEINMANN, 2007).

Aus Reptilien werden seit den 90er Jahren regelmäßig Ranaviren isoliert (UHLENBROK, 2010). Es sind vor allem Landschildkröten aber auch Echsen und Schlangen betroffen. Sie wurden bisher aus Landschildkröten, Dosenschildkröten und Wasserschildkröten aus Europa, Asien und den USA isoliert. Erste Nachweise von Iridoviren bei Landschildkröten wurden im Zusammenhang mit einer Hepatitis bei einer griechischen Landschildkröte von HELDSTAB und BESTETTI (1982) beschrieben. Die ersten Beschreibungen einer seuchenhaften Verlaufsform beschrieben MÜLLER et al. (1988) bei 2000 importierten Griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni*) aus Jugoslawien. Sie unterschieden dabei zwei Verlaufsformen. Einen subakuten Verlauf für den Rhinitis purulenta, Konjunktivitis, Stomatitis ulcerosa, Pneumonie und massive Ansarka charakteristisch waren, von dem akuten Verlauf, mit plötzlichem Hängenlassen des Kopfes, Maulatmung und subkutanen Ödemen am Hals. In den USA traten bei freilebenden Gopher-Landschildkröten (*Gopherus polyphemus*) Erkrankungen der oberen Atemwege auf (WESTHOUSE et al. 1996). Diese Nachweise erfolgten bis dato nur histologisch und Elektronenmikroskopisch aus veränderten Organen. Bei der histologischen Untersuchung sind deutliche intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen nachzuweisen, diese sind elektronenmikroskopisch als hexagonale Viruspartikel mit einem Durchmesser von 135-150 nm vor allem in den Hepatozyten zu finden. MARSCHANG (1998) gelang die erste Isolierung von Iridoviren mittels Zellkultur aus einer Griechischen Landschildkröte mit Stomatitis. Dabei zeigte sich, dass das Virus sich in verschiedenen Zelllinien vermehrt, jedoch nur bei einer Temperatur von 28 °C und nicht bei 37 °C. Das Ergebnis der Sequenzierung eines Isolats zeigte Ähnlichkeit zum Genus *Ranavirus*. Dies konnte durch JOHNSON et al. (2008) ebenfalls bei Sternschildkröten (*Geochelone platynota*) beschrieben werden. Ihnen gelang es, Iridoviren mittels Zellkultur nachzuweisen und mittels PCR und Sequenzierung dem Genus *Ranavirus* zuzuordnen. PCRs zum Nachweis eines

Iridovirus beim lebenden sowie beim toten Tier wurden auf der Basis des konservierten Major capsid protein- (MCP) Genes entwickelt (MAO et al., 1997; MARSCHANG et al., 1999; JUST und ESSBAUER, 2001). DEVOE et al. (2004) konnten Iridoviren bei Östlichen Dosenschildkröten (*Terrapene carolina carolina*) nachweisen. Untersuchungen aus dem Jahr 2007 von BENETKA zeigten, dass Iridoviren auch bei importierten Pantherschildkröten (*Geochelone pardalis*) zu finden sind. Klinisch ähnelt eine Ranavirusinfektion einer Herpesvirusinfektion der Landschildkröten. Die erkrankten Tiere sind lethargisch, anorektisch, zeigen Rhinitis, ulzerative Stomatitis, Pneumonie sowie eine Konjunktivitis. Pathologisch-anatomisch sind auch oft eine Enteritis und Hepatitis zu sehen. Serologische Nachweismethoden wurden bisher kaum etabliert. In Australien wurde ein ELISA von ARIEL (1997) für die Detektion von Antikörpern gegen Ranaviren bei wasserassoziiert lebenden Reptilien entwickelt, der sich bisher nicht im täglichen Gebrauch durchsetzen konnte. Erst kürzlich wurde von UHLENBROK (2010) ein ELISA beschrieben, der sich für Bestandsuntersuchungen bei Landschildkröten eignet.

### 2.8.3 Familie Reoviridae

Die Familie Reoviridae besteht aus unbehüllten 60-80 nm großen Viren, sie besitzen eine doppelsträngige RNA. Die Familie besteht aus 12 Genera, wobei nur *Orthoreovirus*, *Rotavirus*, *Orbivirus*, *Coltivirus*, *Seadornavirus* und *Aquareovirus* bei Vertebraten eine Rolle spielen. Alle bei Reptilien gefundenen Reoviren konnten dem Genus *Orthoreovirus* zugeordnet werden. Es werden 5 Spezies innerhalb des Genus *Orthoreovirus* klassifiziert. *Mammalian orthoreovirus*, *Avian orthoreovirus*, *Nelson Bay orthoreovirus*, *Baboon orthoreovirus* und das *Reptilian orthoreovirus* (CHAPPELL et al., 2005). Elektronenmikroskopisch wurden Reoviren erstmals durch COOPER et al. (1982) bei einer Smaragdeidechse (*Lacerta viridis*) nachgewiesen. Bis heute werden sie überwiegend aus Schlangen und Echsen isoliert (JACOBSEN, 1986; AHNE et al., 1987; BLAHAK et al., 1995:). Beschreibungen bei Landschildkröten gibt es bis heute nur in einem Fall bei einer Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) durch MARSCHANG (2000). Das

Tier war kachektisch. In der Sektion waren eine Nekrose des Zungenepithels und eine Splenomegalie aufgefallen.

Im Elektronenmikroskop konnten ikosaedrische Viruspartikel mit einem Durchmesser von 75 nm nachgewiesen werden. Eine Virusisolierung mittels Zellkultur gelang aus Zunge, Lunge, Leber, Ösophagus und der Niere. Reptilienreoviren bilden in Zellkulturen große, recht typische Synzytien. Aufgrund der Größe und der Morphologie der Viruspartikel wurde es der Familie Reoviridae zugeordnet (MARSCHANG, 2000).

Bei wildlebenden maurischen Landschildkröten (*Testudo graeca*) in der Türkei konnten im Virusneutralisationstest Antikörper gegen Reoviren gefunden werden (MARSCHANG und SCHNEIDER, 2002). Die klinische Bedeutung von Reoviren ist bis heute nicht ganz klar. Sie werden relativ häufig vor allem aus Echsen und Schlangen isoliert, können aber keinem genauen Krankheitsbild zugeordnet werden (ESSBAUER und AHNE, 2001). Sie wurden bisher vor allem im Zusammenhang mit plötzlichen Todesfällen und ZNS-Störungen gefunden.

#### **2.8.4 Familie Paramyxoviridae**

Die Viruspartikel der Familie Paramyxoviridae sind 150 nm und größer, sie besitzen eine einzelsträngige RNS mit negativer Polarität, sind meist pleomorph und besitzen eine lipidhaltige Hülle. *Paramyxoviridae* werden in 2 Subfamilien unterteilt: *Paramyxovirinae* mit den Genera *Rubulavirus*, *Avulavirus*, *Respirovirus*, *Henipavirus*, *Ferlavirus* und *Morbillivirus* und der Subfamilie *Pneumovirinae* mit den Genera *Pneumovirus* und *Metapneumovirus* (LAMB et al., 2005). Paramyxovirusinfektionen spielen besonders bei Schlangen eine große Rolle. Sie kommen weltweit in privater sowie zoologischer Haltung vor und führen immer wieder zu Erkrankungen und Verlusten (FOELSCH und LELOUP, 1976; ESSBAUER und AHNE, 2001; WEST et al., 2001; KOLESNIKOVAS et al., 2006). Die ersten Beschreibungen stammen aus dem Jahre 1976 von FOELSCH und LELOUP. In einem Serpentarium in der Schweiz kam es zu einem seuchenhaften Ausbruch bei Giftschlangen mit respiratorischen und zentralnervösen Symptomen. Dabei konnte aus einer Lanzenotter (*Bothrops atrox*) ein Virus in einem embryonierten Schlangenei angezüchtet werden. Dieses Isolat wurde Fer-

de-lance-Virus genannt und von CLARK et al. (1979) als Paramyxovirus (PMV) identifiziert. Es wurde vollständig sequenziert und als neues Genus *Ferlavirus* in die Subfamilie der *Paramyxovirinae* eingeordnet (KURATH et al., 2005). Bei Echsen gibt es nur Einzelnachweise einer Paramyxovirusinfektion. Man hat bei Wildtieren sowie bei Echsen in Gefangenschaft Antikörper gegen das Reptilien Paramyxovirus finden können (GRAVENDYCK et al., 1998; MARSCHANG et al., 2002). Isolation eines Paramyxovirus bei Echsen ist bislang ebenfalls sehr selten und gelang bisher nur durch AHNE und NEUBERT (1991), GRAVENDYK et al. (1998) und MARSCHANG et al. (2002). Bei Schildkröten gibt es bisher nur eine Beschreibung von ZANGGER et al. (1991), die den elektronenmikroskopischen Nachweis von Paramyxovirus-ähnlichen Partikeln im Zusammenhang mit Dermatitis bei importierten Landschildkröten enthalten. Ein Nachweis der Virusisolierung bei Landschildkröten fehlt bisher gänzlich.

#### **2.8.5 Familie Picornaviridae**

Alle Picornaviren zeigen einen ähnlichen Aufbau, sie haben ein ikosaedrisches Nukleokapsid mit einer Größe von etwa 20-25 nm, sie besitzen eine einzelsträngige RNS und keine Hülle. Die RNS weist eine Positivstrangorientierung auf. Das Kapsid besteht aus vier Virusproteinen, VP1-VP4. Gelegentlich findet man ein fünftes Polypeptid, welches unregelmäßig auftritt. Dies wird als VP0 bezeichnet und stellt den Vorläufer der Komponenten VP2 und VP4 dar. Das Genom ist zwischen 7.200 und 8.450 Basen lang. Durch die Plusstrang-Orientierung benötigen sie keinen Zwischenschritt für die Replikation, so kann schon die isolierte Nukleinsäure eine Infektion hervorrufen. Das Genom der Picornaviren enthält einen einzigen, großen offenen Leserahmen, welcher ein Vorläuferprotein kodiert. Experimentell ist es ein nicht fassbares Polyprotein, welches während der Synthese in verschiedene virale Komponenten aufgespalten wird. Diese Komponenten sind Struktur- und Nichtstrukturproteine sowie virale Enzyme. Zwischen dem 5'-Ende des Genoms und dem Startcodon für die Translation befindet sich ein nicht translaterter Sequenzabschnitt, dieser liegt häufig in intramolekularer Basenpaarung vor. Dies bedeutet, dass der Basenabschnitt am 5'-Ende eine ausgeprägte Sekundärstruktur aufweist. Man

bezeichnet ihn als *internal ribosomal entry site (IRES)*. Dieser erlaubt die Bindung an Ribosomen unabhängig von einer 5'-Cap-Struktur, wie sie gewöhnlich am 5'-Ende eukaryotischer mRNA-Moleküle vorliegt. Mutationen in diesem Bereich können die Translatierbarkeit der mRNA und die Virulenz stark beeinflussen (Stanway et al., 2005).

Picornavirusinfektionen führen bei Mensch und Tier häufig zu Erkrankungen. Es gibt 12 Genera und viele noch nicht klassifizierte Isolate in der Familie *Picornaviridae*. Zu den Genera zählen *Enterovirus*, *Rhinovirus*, *Cardiovirus*, *Aphthovirus*, *Hepatovirus*, *Parechovirus*, *Erbovirus*, *Kobuvirus*, *Teschovirus*, (STANWAY et al., 2005). Laut vorläufigen, noch nicht publizierten Angaben der Picornavirus Study Group ([www.picornaviridae.com](http://www.picornaviridae.com)) soll es folgende neue Genera geben: *Sapelovirus*, *Senecavirus*, *Tremovirus* und *Avihepatovirus*.

Alle Picornaviren werden in säurelabile und säurestabile unterteilt. Säurelabile Picornaviren rufen meist Infektionen des Nasen-Rachen-Raumes hervor. Säurestabile hingegen verursachen Infektionen des Magen-Darm-Trakts.

Die ersten Beschreibungen von Picornavirus-ähnlichen Partikeln bei Reptilien stammen von HELDSTAB und BESTETTI (1984). Sie fanden bei einer Abgottschlange (*Boa constrictor*) und einer Äskulapnatter (*Elaphe longissima*) mit gastro-intestinalen Störungen in der elektronenmikroskopischen Untersuchung 20-25 nm große Partikel, die sie als Picornavirus-ähnlich beschrieben.

Bei Landschildkröten wurde von MARSCHANG (2000) erstmals ein zytopathogenes Agens beschrieben, welches aus verschiedenen adulten Tieren (*Testudo graeca*, *Test. hermanni*, *Test. marginata*, *Agr. horsfieldii*; *Test. kleinmanni*, *Geochelone pardalis*) isoliert werden konnte. Klinisch zeigten diese Tiere Rhinitis, diphtheroid-nekrotisierende Stomatitis, Pharyngitis und Konjunktivitis. In der Sektion konnte bei vielen der untersuchten Tiere eine Pneumonie, Enteritis und ein Aszites gefunden werden.

Die Virusisolation gelang beim lebenden Tier aus Konjunktival-, Rachen- und Kloakentupfern. Bei toten Tieren gelang die Isolation aus Zunge, Trachea, Lunge, Ösophagus, Magen, Dünndarm, Milz, Leber, Herz und Gonaden. Aufgrund aller von MARSCHANG (2000) durchgeführten Untersuchungen lag der Verdacht nahe, dass es sich aufgrund der Größe und der Morphologie um ein unbehülltes RNS-

Virus handelt, welches Membranfilter mit einer mittleren Porengröße von 100 nm passiert. Elektronenmikroskopische Darstellungen von Viruspartikeln gelangen nicht.

In Untersuchungen von MARSCHANG und RÜMENAPF (2002) sind sogenannte Virus X-Isolate besonders häufig bei Maurischen Landschildkröten (*Testudo graeca*) und Breitrandschildkröten (*Testudo marginata*) zu finden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Zellkulturmedien, Pufferlösungen und Reagenzien

##### **Basal Medium Eagle's (BME) mit Earleschen Salzen (1 Liter)**

100,0 ml/l	BME Earle Instamed 9,3 g/l mit L-Glutamin (Seromed, Biochrom, Berlin)
100,0 ml/l	Tryptose-Phosphat-Brühe (TPB) Stammlösung: 29,5 g/l TPB-Pulver (Difco, Michigan) inH <sub>2</sub> O
50,0 mg/l	Gentamycinsulfat (663 U/mg, Seromed, Biochrom, Berlin)
0,5 ml/l	Candio-Hermal (Nystatin, Hermal, Heidelberg)
15,0 ml/	Hydroxyethyl-piperazin-ethansulfonsäure (Hepes, 1M) (Serva, Heidelberg)

Gelöst in Aqua dest. und mit 5 N NaOH (Merck, Darmstadt) auf pH = 7,5 eingestellt.

##### **Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's-Salzen (1x)**

Biochrom AG (Berlin)

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

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

Gelöst in Aqua dest. und sterilfiltriert.

##### **Trypsin-Versen-Lösung (TV)**

3,5 g/l	Trypsin
0,2 g/l (0,001 M)	EDTA x Na <sub>2</sub> (Serva, Heidelberg)
1,0 g/l (0,001 M)	D(+)- Glucose-Monohydrat
0,5 ml/l	Phenolrotlösung (1 g/l) (Merck, Darmstadt)

Gelöst in DPB und mit 1 M NaOH auf pH = 7,5 eingestellt

### **Na-Zitrat-Lösung**

38 g/l Natriumzitrat-2-hydrat (Merck, Darmstadt)

in Aqua dest. gelöst und autoklaviert

### **Chloroform**

Pro analysis (Merck, Darmstadt)

### **5-Jod-2`-Desoxyuridin (IUDR)**

50 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)

### **Actinomycin D**

1 µg/ml (Sigma, St. Louis, MO, USA)

### **Stammlösungen pH-Stabilität**

Stammlösung A: 0,1 M Zitronensäure (21,008 g/l)

Stammlösung B: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·x 2H<sub>2</sub>O (35,62 g/l)

Stammlösung C: 0,1 M NaOH

#### ***3.1.2 Eingesetzte Zellkulturlinien***

**Terrapene heart cells** (TH-1): Bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC CCL 50)

**Russel's viper heart cells** (VH-2): erhalten vom Friedrich Loeffler-Institut, Insel Riems, ursprünglich bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC CCL 140)

**Hühnerembryo-Fibroblasten** (HEF): Hergestellt aus 10 Tage alten Hühnerembryonen nach PURCHASE und SCHATT (1998)

**Hühnerembryo-Leberzellen** (HELZ): Hergestellt aus 10-11 Tage alten Hühnerembryonen nach PURCHASE und SCHATT (1998)

**Madin Darby Bovine Kidney-Zellen** (MDBK): Bezogen von der American Type Culture Collection (ATCC CCL 22)

### **3.1.3 Eingesetztes Kontrollvirus**

Ein Herpesvirusisolat mit der Tagebuchnummer 302/04 aus einer Griechischen Landschildkröte isoliert in der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Fische, Justus-Liebig-Universität, Giessen wurde als Kontrolle bei den Untersuchungen mit Chloroform, IUDR und für die Prüfung der pH-Stabilität eingesetzt.

### **3.1.4 Weitere Materialien und Geräte**

Zellkulturgefäße	Greiner, Frickenhausen
Pipetten: 1-10 µl, 10-100 µl und 20-200 µl	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät: Branson sonifer B-15	Branson Sonic Power, Danbury, CO, USA
Brutschrank:	Heraeus, Hanau
Hettich Rotanta/T Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge: Hettich Mikro 12-24	Hettich, Tuttlingen
Ultrazentrifuge: Beckman L8-55	Beckman, München
pH-Meter: Mettler Toledo Seven Easy	Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Schweiz
Wasserbad	Köttermann Labortechnik,
Autoklav	Tuttbauer 3850EL, Breda, Niederlande)
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Elektronenmikroskop: Zeiss EM 10CR	Zeiss, Wetzlar

### **3.1.5 Untersuchte Landschildkröten**

Im Rahmen meiner Untersuchungen wurden 57 Landschildkröten aus neun Spezies untersucht. Bei den maurischen Landschildkröten handelt es sich allerdings um zwei Subspezies. Die Tiere waren unterschiedlichen Alters. Alle untersuchten Tiere stammen aus einem Bestand. Die Speziesverteilung ist der Tabelle 1 zu entnehmen.

**Tabelle 1: Insgesamt untersuchte Landschildkröten**

Wissenschaftliche Bezeichnung	Deutsche Bezeichnung	Anzahl der untersuchten Tiere	
		juvenil	adult
<i>Testudo hermanni</i>	Griechische Landschildkröte	0	12
<i>Testudo graeca iberica</i> und <i>T. g. terrestris</i>	Maurische Landschildkröte	7	17
<i>Agronemys horsfieldii</i>	Vierzehen-Landschildkröte	0	3
<i>Testudo carbonaria</i>	Köhlerschildkröte	0	3
<i>Testudo marginata</i>	Breitrandschildkröte	0	8
<i>Astrochelys radiata</i>	Strahlenschildkröte	0	1
<i>Geocholeone pardalis</i>	Pantherschildkröte	0	2
<i>Geochelone elegans</i>	Indische Sternschildkröte	1	1
<i>Adabrachelis gigantea</i>	Seychellen-Riesenschildkröte	0	2
<i>Teilsommen</i>		8	49
<b>Summe gesamt</b>		<b>57</b>	

### 3.1.6 Untersuchte Tupferproben von Landschildkröten

Es wurden insgesamt 104 Tupferproben von lebenden Tieren untersucht, davon 18 Konjunktivaltupfer, 43 Rachentupfer, 43 Kloakentupfer (siehe Tabelle 11 im Anhang). Für die Probenentnahme wurden sterile Stabtupfer verwendet, welche vorher mit steriler NaCl-Lösung angefeuchtet wurden.

### 3.1.7 Blutserumproben für den Virusneutralisationstest

Für die Entnahme der Blutproben wurden nur adulte Tiere (n=19) verschiedener Spezies ausgewählt. Es wurden stichprobenartig Blutproben möglichst vieler verschiedener Spezies genommen, wobei ein Hauptaugenmerk auf den Maurischen und den Griechischen Landschildkröten lag. Vor der Blutentnahme wurde der Schwanz der Tiere gereinigt und mit Kodan® desinfiziert. Die Blutentnahme erfolgt immer mit einer 23 Gauge Kanüle, die zuvor mit Na-Citrat durchgespült wurde. Das Blut wurde aus der *Vena intervertebralis dorsalis* (GÖBEL und SPÖRLE, 1991) entnommen und in Eppendorfgefäße überführt. Durch

Zentrifugieren wurde der Blutzellanteil abgetrennt und das erhaltene Blutserum bis zur Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

Schildkrötenspezies und Anzahl der Proben sind aus Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 2: Tierart und Anzahl der gewonnenen Blutserumproben**

<b>Spezies der Landschildkröten</b>	<b>Anzahl der Blutserumproben</b>
<i>Testudo marginata</i>	3
<i>Testudo graeca iberica</i>	5
<i>Testudo hermanni boettgeri</i>	4
<i>Geochelone elegans</i>	2
<i>Geochelone sulcata</i>	1
<i>Adabrachelis gigantea</i>	1
<i>Geochelone carbonaria</i>	3
<b>Summe</b>	<b>19</b>

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Klinische Untersuchungen**

Die klinische Untersuchung der 8 juvenilen und 49 adulten Landschildkröten stellte eine rein adspektorische Allgemeinuntersuchung dar. Sie umfasste neben der Beurteilung des Ernährungszustandes die Lage der Augäpfel und eine sorgfältige Kontrolle der Tiere bezüglich Verletzungen oder anderen pathologischen Veränderungen. Neben klinischen Symptomen wie Augenausfluss, Konjunktivitis, Rhinitis, Atemgeräuschen wurde besonders auf Veränderungen des Panzers geachtet. Während der Tupferprobenentnahme wurde auch eine Adspektion der Maulhöhle vorgenommen.

### **3.2.2 Parasitologische Untersuchungen**

Für die parasitologischen Untersuchungen wurden mehrfach Sammelkotproben aus den Gehegen der adulten und der juvenilen Schildkröten nativ und nach einer Flotation untersucht. Im Rahmen der Sektion von den juvenilen Tieren wurde ein Kotausstrich nativ hinsichtlich eines parasitären Befalls untersucht. Für die

Flotation wurden die Kotproben mit gesättigter NaCl-Lösung versetzt, gut durchmischt und durch ein feines Teesieb in ein Reagenzglas gegossen. Die Oberfläche des Reagenzgläschens wurde mit einem Deckgläschen bedeckt und das Röhrchen 20 Minuten bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die mikroskopische Untersuchung der Präparate wurde nach Standardmethoden durchgeführt (NÖLLER und OTTEN, 1921).

### 3.2.3 Pathologisch-anatomische Untersuchungen

Zur pathologisch-anatomischen Untersuchung konnten 8 juvenile, gestorbene oder euthanasierte Landschildkröten mit stark erweichten Panzern und reduziertem Allgemeinbefinden untersucht werden.

Die Tiere wurden im Rahmen der Sektion auf makroskopisch sichtbare Veränderungen untersucht. Dabei erfolgte eine Probenentnahme der in Tabelle 3 aufgelisteten acht inneren Organe.

**Tabelle 3: Organe der 8 seziierten juvenilen Landschildkröten für die Virusisolierung und mikrobiologischen Untersuchungen**

Tgb.- Nr.		Gewicht	Geschlecht	Untersuchte Organe
402/1	T.g.i	22 g	m	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi
402/2	T.g.i	18 g	m	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi
1443/1	T.g.i	25 g	w	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi
1243/62	T.g.i	28 g	m	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi
1243/37	T.g.i	23 g	m	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi
1705	T.g.i	30 g	w	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi
1704	G.e.	29 g	w	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi
782	T.g.t.	27 g	m	Hi, Zu, Lu, He, Da, Ni, Le, Mi

Bei toten Tieren: Hi = Gehirn; Zu = Zunge; Lu = Lunge; He = Herz; Le = Leber; Ni = Niere; Da = Darm; Mi = Milz

Spezies: T. g. i. = *Testudo graeca iberica*; T. g. t. = *Testudo graeca terrestris*, G. e. = *Geochelone elegans*

Geschlecht: m = männlich; w = weiblich

### **3.2.4 Bakteriologische und mykologische Untersuchungen**

Bakteriologische und mykologische Untersuchungen fanden nur bei den 8 seziierten juvenilen Landschildkröten statt. Hierfür wurden aus jeweils allen Organen Proben entnommen und je eine bakteriologische (BPLS und Blutagar) und eine mykologische Kultur (Kimmig-Agar) angelegt. Alle angelegten Kulturen wurden bei 28 °C aerob bebrütet und nach 48 Stunden auf Koloniewachstum untersucht. Waren Kolonien entstanden, erfolgte eine Differenzierung nach Standardmethoden (ROLLE und MAYR, 2007).

### **3.2.5 Pathohistologische Untersuchungen**

Bei den pathohistologisch untersuchten Tieren handelt es sich um eine, neun Monate alte *Test. graeca ibera* (Tgb-Nr.:1705) und eine einjährige *Test. graeca terrestris* (Tgb-Nr.:782). Von der *Testudo graeca graeca* wurden der Panzer, sowie Knochenmark, Leber, Niere, lange Röhrenknochen untersucht. Von einer *Testudo graeca terrestris* konnten nur die Knochen untersucht und beurteilt werden.

Die Proben wurden für die histopathologische Untersuchung in 10 %iges Formalin eingelegt und zu Frau Dr. Helene Pendl an PendlLab, Steinhausen, Schweiz, geschickt. Dort wurden nach Standardmethoden Schnitte hergestellt, mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) Peroxid-Säure-Reaktion (PAS) und Eisenhämatoxylinfärbung gefärbt und untersucht (ROMEIS, 2010) Die Auswertung und Beurteilung der histopathologischen Präparate erfolgte gemeinsam mit Frau Dr. Pendl.

### **3.2.6 Kultivierung und Subkultivierung von Zellkulturen**

*Terrapene heart cells* (TH-1), *Russell's viper heart cells* (VH2), *Hühnerembryofibroblasten* (HEF), *Hühnerembryoleberzellen* (HELZ), *Madin Darby Bovine Kidney cells* (MDBK) wurden in BME gehalten. Dem BME wurden 5 % FKS und 0,4 ml Baytril® 2,5 % hinzugegeben. Dieses Medium wurde zum Subkultivieren und Erhalten der Zellkulturen verwendet. Zum Anzüchten der Zellen wurde dem BME 10 % FKS und ebenfalls 0,4 ml Baytril 2,5 % hinzugefügt. Die Reptilienzellen TH-1 und VH-2 wurden bei 28 °C die

HEF, HELZ, und MDBK bei 37 °C. im Brutschrank gehalten. Die permanenten Zelllinien TH-1 und VH-2 wurden alle 7-14 Tage mit Trypsin-Versen-Lösung abgelöst und in neue Flaschen bzw. in Zellkultur-schälchen 1:2 oder 1:4 subkultiviert. Die MDBK wurden mir freundlicherweise vom Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (FB Veterinärmedizin), Justus-Liebig-Universität, Giessen zur Verfügung gestellt.

Die HEF und HELZ wurden aus 10 Tage alten SPF-Hühnerembryonen hergestellt und 1-2 Tage später inokuliert.

### **3.2.6.1 Probenaufbereitung und Virusisolierung**

Die 104 entnommenen Tupferproben sowie die 64 Organproben der Landschildkröten wurden nach ihrer Entnahme sofort in Röhrchen mit BME plus 0,001 % Enrofloxacinzusatz (Baytril®, Bayer AG, Leverkusen) überführt und auf Zellkulturen aufgebracht oder zunächst im Kühlschrank bei 4 °C für 1-2 Tage aufbewahrt. Vor dem Aufbringen der Proben wurden diese mit Ultraschall (Branson sonifer) drei Pulse bei 60 % behandelt und anschließend für 10 min bei 3000 x g zentrifugiert (Hettich Rotanta/T). 0,2 ml des Überstandes wurde auf Monolayer von TH-1 und VH-2 verimpft, zwei Stunden bei 28 °C inkubiert und nach Zugabe von BME bei 28 °C inkubiert. Die Zellen wurden täglich auf zytopathische Effekte (ZPE) kontrolliert. War ein ZPE sichtbar, wurden die Zellen und Überstand mit einem Zellschaber geerntet und wie oben beschrieben aufgearbeitet und nochmals auf einen neuen Monolayer aufgebracht. Die Proben, bei denen nach 14 Tagen kein ZPE zu sehen war, wurden daraufhin nochmals passagiert und für weitere 14 Tage inkubiert. Die HEF-, HELZ- und MDBK-Kulturen wurden auf gleiche Weise wie die Reptilienzellkulturen inokuliert, aber bei 37 °C für maximal 14 Tage inkubiert.

### **3.2.7 Virustitrationen**

Die Virustitration aller Isolate wurde durchgeführt, um möglichst hochtitrige Isolate für die weiteren Untersuchungen verwenden zu können. In Reagenzröhrchen wurden hierfür Verdünnungsreihen mit BME von  $10^0$  bis  $10^7$  vorbereitet. Die Virusisolate wurden in diesen Röhrchen verdünnt. Für die

Titrationen wurden von 96er Wellplatten mit ausgewachsenem TH-1-Zellrasen das Medium abgegossen und anschließend je Verdünnungsstufe fünf Wells mit jeweils 100 µl der verdünnten Virussuspensionen beimpft. Die Virustitration wurde mit allen Proben, die einen ZPE zeigten, durchgeführt. Anschließend wurden die Platten zwei Stunden bei 28 °C bebrütet, dann mit Medium überschichtet und 5-7 Tage inkubiert. Lichtmikroskopisch wurde der ZPE abgelesen. Die  $KID_{50}$  je ml wurde nach der Formel von SPEARMAN und KÄRBER (MAYR et al., 1977) berechnet.

### **3.2.8 Untersuchungen zur Identifizierung der Isolate**

Die Proben mit ZPE, die sich in der gleichen Zellkultur passagieren ließen, wurden mit einem Zellschaber geerntet, mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Da sich nach der Inokulation bei allen Proben der ZPE hinsichtlich Zeit der Entstehung p.i., der Art der Zellveränderungen und der Ausdehnung dieser Veränderungen im Zellrasen sehr gleichartig darstellte, wurden fünf Isolate mit einer  $KID_{50}$  je ml von  $10^7$  zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Die gewählten Isolate für die weitere Identifizierung tragen die Tagebuch-Nummern 1243/62 Hi, 402/1 Ni, 402/Zu, 1443/1 Hi, 1243/37/Zu. Als Negativ-Kontrolle diente immer eine nicht infizierte Zellkultur.

#### **3.2.8.1 Chloroformbehandlung der Isolate**

Überstand aus inokulierten Zellkulturen mit deutlichem ZPE wurden mit Chloroform versetzt, um ihre Empfindlichkeit zu prüfen. Dies dient der Unterscheidung zwischen behüllten und unbehüllten Viren. Es wurden hierfür die fünf oben genannten Isolate (1243/62 Hi, 402/1 Ni, 402/Zu, 1443/1 Hi, 1243/37/Zu) verwendet. Überstände dieser Kulturen wurden geerntet, mit Ultraschall behandelt und bei 1000 x g zentrifugiert. 0,9 ml des Überstandes wurden mit 0,1 ml Chloroform versetzt, eine Stunde auf einem Rüttler geschüttelt und dann über Nacht bei + 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt (MAYR et al., 1974). Es wurde dann je eine mit und eine ohne Chloroform behandelte Probe auf TH-1-Zellkulturen aufgebracht. Es wurde täglich lichtmikroskopisch auf einen

auftretenden ZPE untersucht. Die Proben, die einen deutlichen ZPE zeigten, wurden von  $10^1$ - $10^7$  verdünnt und auf 96er Wellplatten mit ausgewachsenen TH-1 Zellen aufgebracht. Nach 7 tägiger Inkubation wurden die Ergebnisse der Titrationen lichtmikroskopisch abgelesen.

Handelt es sich um ein behülltes Virus, verliert es durch die Chloroformzugabe seine lipidhaltige Hülle und dadurch seine Vermehrungsfähigkeit. Ist es unbehüllt, kann es sich weiterhin vermehren, was sich am entstehenden ZPE zeigt. Als Kontrolle diente ein Herpesvirusisolat aus einer griechischen Landschildkröte (Tagebuch-Nr.: 302/04), dessen Vermehrung gehemmt wird.

### **3.2.8.2 Kultivierung der Isolate mit 5-Iodo-2'-Desoxyribonukleinsäure (IUDR)**

IUDR ist ein Pyrimidinanalogon, welches bei der Replikation von DNS-haltigen Viren anstelle von Thymidin in die DNS eingebaut wird und dadurch die Virusreplikation hemmt. Bei RNS-haltigen Viren hat IUDR keinen Angriffspunkt, so dass diese Viren sich ungehemmt vermehren können. Die positiven Proben wurden passagiert, zwei Stunden inkubiert und anschließend wurde dem einen Schälchen Medium mit Zusatz von IUDR (50µg/ml) und dem anderen IUDR-freies Medium hinzugegeben. Sobald ein ZPE auftrat wurden die Schälchen geerntet und titriert (LUKERT, 1989).

Ein Isolat wird als RNS-haltig bewertet, wenn sich das zu untersuchende Isolat in Zellkultur nach Zugabe von IUDR weiterhin vermehrt, und das DNS-haltige Kontrollvirus (Herpes) in der Vermehrung gehemmt wird.

### **3.2.8.3 Empfindlichkeit der Isolate gegenüber Aktinomycin D**

Durch Zugabe von Aktinomycin D wird die Transkription der mRNS doppelsträngiger Nukleinsäuren verhindert, so dass bei doppelsträngigen DNS- sowie dsRNS-Viren keine Proteinsynthese ablaufen kann (HORZINEK, 1975). Aktinomycin D wird in einer Konzentration von 1 µg/ml dem MEM hinzugegeben und auf ausgewachsenen TH-1-Zellkulturen aufgebracht (VILLEGAS und LUKERT, 1998).

Um sicherzustellen, dass keine Zelltoxizität vorliegt, werden zunächst die TH-1-Zellen für zwei Stunden mit dem Medium inkubiert und anschließend licht-

mikroskopisch überprüft. Das Medium wurde dann entfernt und die Zellen mit infektiösem Zellkulturüberstand der 5 Isolate beimpft. Anschließend wurden 2 ml BME mit 1 µg/ml Actinomycin D dazugegeben. Nach 24 -stündiger Inkubation wurden die Zellen aus inokulierten Schälchen geerntet und titriert. Parallel dazu wurde eine infizierte Zellkultur ohne Actinomycin D geerntet und ebenfalls titriert.

#### **3.2.8.4 Prüfung der pH-Stabilität ausgewählter Isolate mit Hilfe des *Mellvaine Puffers***

Um die pH-Stabilität zu testen, wurden 3 Stammlösungen hergestellt:

A: 0,1 M Zitronensäure (21,008 g/l)

B: 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O (35,62 g/l) und

C: 0,1 M NaOH

Aus diesen 3 Stammlösungen wurden unter Zugabe von 1 N NaOH- bzw. 1 N HCl-Lösungen mit pH 3,0; 5,0; 7,0 und 12 hergestellt. Diese pH-Werte wurden mit einem eichbaren pH-Meter (Mettler-Toledo, Seven Easy) überprüft (MAYR et al., 1974).

Zellkulturüberstand von einer mit Isolat 1243/37 Zu infizierten Zellkultur wurde im Verhältnis 1:10 mit den Gebrauchslösungen gemischt und drei Stunden bei 28 °C inkubiert. Anschließend wurden alle Proben 1:10 mit MEM verdünnt und auf einen pH-Wert von 7,0 justiert. Dann wurden alle Proben in log<sub>10</sub>-Stufen von 10<sup>-1</sup> 10<sup>-8</sup> verdünnt und auf einen TH-1-Monolayer aufgebracht. Eine unbehandelte Probe sowie das Herpesvirus (Tgb.-Nr: 302/04) dienten als Positiv-Kontrollen. Die Titrationen wurden nach einer Inkubation von 5 Tagen abgelesen und beurteilt.

Als pH-stabil wurde ein Isolat bezeichnet, wenn sich in dem Medium mit einem pH von 3 keine Hemmung der Virusvermehrung feststellen ließ, und es bei dem Kontrollvirus (Herpes) eine deutliche Hemmung der Virusvermehrung gab.

### **3.2.8.5 Vermehrung der Isolate in verschiedenen Zelllinien**

TH-1, VH-2, HEF, HELZ und MDBK wurden in 35 mm Schälchen ausgesät und mit infektiösem Zellkulturüberstand des Isolats 1243/37 Zu inokuliert. Die TH-1- und VH-2-Kulturen wurden 2 Stunden bei 28 °C, die HEF und HELZ wurden 1 Stunde bei 36 °C inkubiert. Den Zellen wurde BME zugefügt und 10 Tage inkubiert. Täglich wurden die Kulturen lichtmikroskopisch auf einen auftretenden ZPE untersucht.

### **3.2.9 Elektronenmikroskopische Untersuchung**

Virushaltiger Zellkulturüberstand wurde freundlicherweise von Herrn Dr. W. Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere der Justus-Liebig-Universität Gießen elektronenmikroskopisch untersucht. Es wurden 2 Isolate von Maurischen Landschildkröten mit den Tagebuch-Nummern 1243/37 Zu und 402/1 Ni mit einer  $KID_{50}$  von  $10^7$  je ml nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure elektronenmikroskopisch untersucht.

### **3.2.10 Virusneutralisationstest**

Es wurden 19 Serumproben von sieben Schildkrötenspezies aus einem Bestand auf virusneutralisierende Antikörper gegen das Isolat 1243/37 Zu untersucht. Die zu untersuchenden Blutserumproben wurden zunächst für 30 min bei 56 °C inaktiviert. Eine 2er Verdünnungsreihe der eingesetzten Proben wurde in 96-Wellplatten bis zu einer Verdünnung von 1:256 vorbereitet. 100  $KID_{50}$  je 25  $\mu$ l des zu testenden Virus wurden hinzugegeben und 2 Stunden bei 28 °C inkubiert. Danach wurden frisch subkultivierte Zellen hinzugegeben und weiter bei 28 °C bebrütet. Nach 5 tägiger Inkubation wurden die Platten lichtmikroskopisch abgelesen und beurteilt. Eine Spezifitätsgrenze ist für Antikörper gegen Picornaviren aus Schildkröten bisher nicht angegeben. Deshalb werden alle Antikörpertiter wie abgelesen angegeben.

### **3.2.11 Sequenzierung**

Das Isolat 1243/37 aus der Zunge einer Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) wurde zur Sequenzierung an das Friedrich Loeffler-Institut, Insel Riems, gesendet. Dort wurden freundlicherweise weiterführende Untersuchungen einschließlich der Sequenzierung von Herrn Dr. rer. nat. G. Keil vorgenommen, die in die Beschreibung der Viruseigenschaften aufgenommen wurden.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Klinische Befunde der untersuchten Landschildkröten**

Es konnten im Rahmen der klinischen Untersuchung der 49 adulten Tiere nur bei einer *Geochelone elegans* eine beidseitige Rhinitis festgestellt werden und bei einer *Geochelone pardalis* eine beidseitige Rhinitis sowie Konjunktivitis. Die anderen 47 adulten untersuchten Tiere wiesen keinerlei Veränderungen auf.

Die Jungtiere der Gattungen *Testudo hermanni* und *Testudo marginata* waren klinisch völlig unauffällig. Sie zeigten keinerlei Anzeichen einer Panzererweichung und auch keinerlei andere Symptome. Die Jungtiere der Gattungen *Testudo graeca* und *Geochelone elegans* waren zum Zeitpunkt der Untersuchung etwa 7 Wochen alt. Alle Tiere aus dieser Gruppe zeigten einen weichen Panzer, der auf Fingerdruck deutlich nachgab. Diese Erweichung des Panzers begann mit dem Plastron, danach erst wurde der Carapax weich. Das Plastron veränderte sich auch in der Farbe. Anstelle von einer gelblichen Färbung mit schwarzem Muster wurde es gräulich mit schwarzer Musterung. Es waren noch fünf Jungtiere aus dem Vorjahr in der Gruppe, die laut Besitzer auch einen erweichten Panzer hatten. Diese Tiere verstarben nicht und der Panzer härtete sich aus. Auffallend hierbei war jedoch, dass die Tiere im Wachstum deutlich verzögert erschienen.

### **4.2 Parasitologische Befunde**

Die Sammelkotproben wiesen einen leichten Befall mit *Oxyuris* sp. auf. In allen nativ untersuchten Kotproben von gestorbenen bzw. euthanasierten Jungtieren konnten vereinzelt *Nyctotherus* sp. und *Balantidium* sp. nachgewiesen werden. Es konnten weder im Kot noch in frisch gewonnenem Urin *Hexamita parva* gefunden werden.

### **4.3 Pathologisch-anatomische Veränderungen**

Adulte Tiere aus dem untersuchten Bestand standen mir zur Sektion leider nicht zur Verfügung. Alle acht Jungtiere, die unter einem Jahr alt waren, zeigten außer einer hochgradigen Erweichung des Panzers einen stark dilatierten Harnsack, welcher mit viel weiß-gelblichem Material (wahrscheinlich Harnsäure) gefüllt war.

Bei zwei von acht seziierten Tieren hatten sich Harnsteine gebildet. Die Nieren erschienen bei allen Tieren vergrößert und aufgeheilt.

#### **4.4 Histopathologische Befunde**

In der histologischen Untersuchung zeigte sich bei beiden untersuchten Tieren *Test. graeca tererestris* (Tgb-Nr.: 782) und *Test. graeca ibera* (Tgb-Nr.: 1705) eine massive Störung in der Knochenbildung.

In den untersuchten langen Röhrenknochen fehlte ein strukturierter Aufbau der enchondralen Ossifikation, die Kompakta war sehr dünn und häufig durch Bindegewebe ersetzt. Im Querschnitt des Röhrenknochens war anstelle der geordneten Struktur von Kompakta und Markraum ein großflächig marmoriert erscheinendes Bild von Knochenspangen, welche in embryonales Bindegewebe eingebettet waren. Das Bindegewebe ging ansatzlos in faserige Knochenstruktur über. Osteoidsäume fehlten vollständig, vereinzelt traten Osteoblasten bzw. Osteoklasten auf. Im knochenähnlichen Material waren Zellen mit pyknotischen bzw. nekrotischen Kernen oder völlig leere Lakunen sichtbar (Abb. 5).

Bei den Kopfknochen stellte sich ein ähnliches Bild dar. Die Schädelkalotte bestand aus wenigen Knochenspangen aus embryonalem Bindegewebe. Die Mandibularknochen wiesen ebenso keine Ossifikation auf. Auch hier war wieder nur ein Gemisch aus embryonalem Bindegewebe und knochenähnlichem Material sichtbar.

Auch in den histologischen Schnitten des Panzers zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei den langen Röhrenknochen. Auch hier ließ sich wieder überwiegend embryonales Bindegewebe finden, in welches reaktionslose bis nekrotische Knochenspangen eingelagert waren. Um die Blutgefäße des Bindegewebes befanden sich perivaskuläre Entzündungsreaktionen.

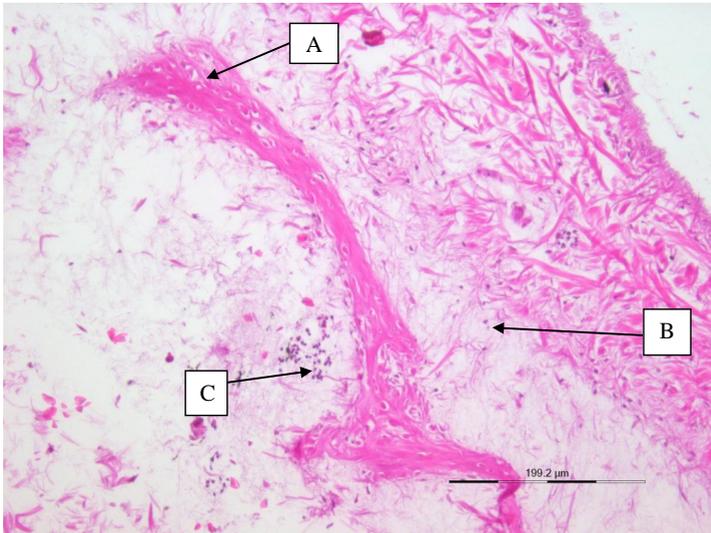
Das Panzerhorn erschien an vielen Stellen regelrecht aufgefasert und mit Falten und Knickbildung der einzelnen Fasern. Mehrfach waren Ansammlungen von Bakterien zwischen den Fasern sichtbar. Die keratinbildende Epithelschicht war an den Knickstellen mechanisch komprimiert bis zu Zusammenhangstrennungen.

In der Leber zeigten sich eine disseminierte Degeneration und Nekrose von Hepatozyten. Die Eisenfärbung war nicht nur in Kupffer-Zellen, sondern auch in

Leberzellen positiv. Eine Erythrophagozytose war regelmäßig erkennbar. Die Kupffer-Zellen erschienen häufig mit bräunlich-schwarzem Material (PAS neg., Eisen neg.) gefüllt. Durch die unterschiedliche Einlagerung von PAS-positivem Material in die Leberzellen erscheint die Leber unter dem Mikroskop leicht marmoriert.

In den Nieren lag teilweise eine deutliche Erweiterung der Tubuluslumina und Sammelröhrchen, eine Tubulonephrose sowie an einigen Stellen mit Regeneraten (doppelkernige Tubulusepithelzellen, dicht zusammengedrängt) vor. Es kam partiell zu einer massiven Erweiterung der interstitiellen Räume. Interstitielles Bindegewebe war oft nicht erkennbar. Die Glomeruli wiesen ein kubisches viszerales Blatt der Bowmann'schen Kapsel auf, die Zellkerne traten deutlich hervor. Die Kapillarschlingen waren oft stark erweitert und leer, Erythrozyten fehlten.

Das periphere Blutbild zeigte eine moderate Anisozytose und Poikilozytose mit z. T. sehr frühen Stadien in den peripheren Gefäßen der Leber. Die Lebergefäße sowie die Kapillarschlingen der Niere erschienen oft „leer“. Das Knochenmark zeigte eine unauffällige Granulopoese. Die Erythropoese wies eine deutliche Lückenbildung mit wenigen Inseln monomorpher Frühzellen auf. Fast alle Sinusoide waren überwiegend „leer“, nur einige Gruppen reifer Erythrozyten waren zu sehen (Abb. 6).



**Abbildung 5: Schnitt durch den Röhrenknochen einer juvenilen *Testudo graeca* (H&E-Färbung)**

A: schmale Knochenspangen

B: embryonales Bindegewebe

C: Bakteriennester



**Abbildung 6: Niere von juveniler *Testudo graeca* (H&E-Färbung)**

A: dilatierte Tubuli

B: interstitielles Ödem mit Hämorrhagien

#### **4.5 Bakteriologische und mykologische Untersuchung der Organproben**

In den untersuchten 64 Organen der acht juvenilen Tiere mit weichem Panzer konnten keine Hinweise auf bakterielle Infektionen gefunden werden. Die isolierten Keime (Staphylokokken, Streptokokken, Bazillen und Enterobakteriazeen) entsprechen der Normalflora bei Schildkröten.

Die mykologische Untersuchung verlief immer negativ.

#### **4.6 Untersuchung der Organproben auf Virusgehalt mittels TH-1-Zellkulturen**

In allen mit den 64 aufbereiteten Organproben aus acht Landschildkröten (siehe Punkt 3.2.6.1) inokulierten TH-1-Kulturen entwickelte sich ein deutlicher ZPE. Dieser ZPE stellte sich bei allen mit Organproben inokulierten TH-1-Zellkulturen sehr ähnlich dar. Schon nach ein bis zwei Tagen rundeten sich die Zellen zum Teil ab, es trat eine beginnende Zellyse auf und andere Zellen wurden spindelförmig

(Abbildung 7 und 8). Nach spätestens 10 Tagen war der gesamte Zellrasen einer Kultur erfasst, und eine vollständige Zelllyse war vorhanden. Dieser ZPE trat auch nach mehrmaliger Passage immer wieder in gleicher Art und Zeitsequenz auf. Die Entstehung des ZPE war begleitet von einer Verfärbung des Zellkulturmediums von rot nach gelb.

Die Überstände und veränderten Zellen aus allen Zellkulturen mit ZPE wurden anschließend titriert, um quantitative Hinweise auf den Virusgehalt zu erhalten. Die Virusgehalte aller 64 Organproben sind in Tabelle 4 als  $KID_{50}$  je ml aufgelistet.

**Tabelle 4: Infektiositätstiter der 64 untersuchten Organproben in TH-1 Zellkultur**

Tagebuch-Nr. und Spezies	Virustiter in $10^x$ $KID_{50}$ je ml der Isolate aus 64 Organen							
	Gehirn	Zunge	Lunge	Herz	Darm	Niere	Leber	Milz
402/1 T. g. i.	6,5	6,5	5,5	4,0	4,5	7,5	5,0	5,5
402/2 T. g. i.	6,1	7,3	5,2	4,5	5,1	6,5	5,8	5,5
1243/37 T. g. i.	6,5	7,1	6,0	5,5	5,5	6,0	5,5	5,0
1243/62 T. g. i.	7,1	6,5	5,5	5,0	5,5	6,0	5,5	6,0
1443/1 T. g. i.	7,1	6,5	5,0	4,5	5,5	6,0	5,0	5,5
1704 G. e.	5,9	5,5	4,1	3,0	5,5	5,5	5,0	5,0
1705 T. g. i.	6,5	6,0	4,5	3,5	5,5	6,0	4,5	6,1
782 T. g. t.	6,5	6,5	5,0	5,5	5,0	5,8	5,5	4,0
Mittelwerte	6,5	6,5	5,1	4,4	5,3	6,2	5,2	5,3

T. g. i.: *Testudo graeca iberica*

T. g. t.: *Testudo graeca terrestris*

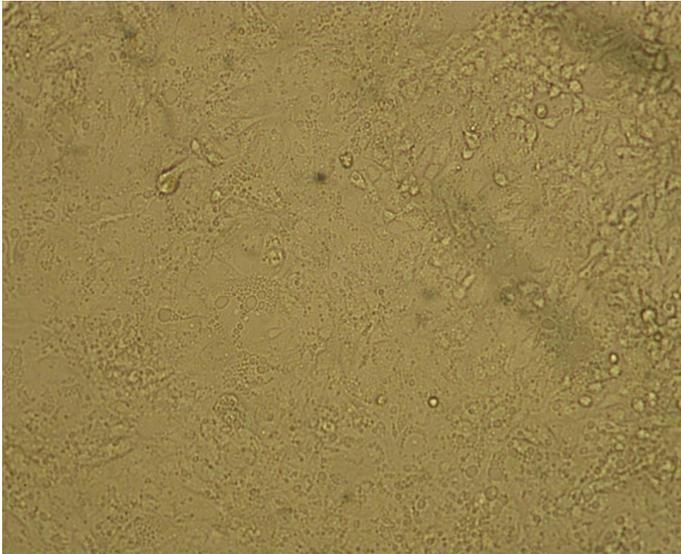
G. e.: *Geochelone elegans*

In Proben aus Gehirn und Zunge wurden die höchsten Virusgehalte, im Mittel  $10^{6,5}$   $KID_{50}$  je ml, gemessen. Den nächst höchsten Gehalt erbrachten die gemittelten Werte der Nieren mit  $10^{6,2}$   $KID_{50}$  je ml. In Proben aus Lunge, Darm, Leber und Milz bewegten sich die Mittel der Virusgehalte zwischen  $10^{5,1}$  und  $10^{5,3}$   $KID_{50}$  je ml. Nur die Proben aus den Herzen hatten im Mittel mit  $10^{4,4}$   $KID_{50}$

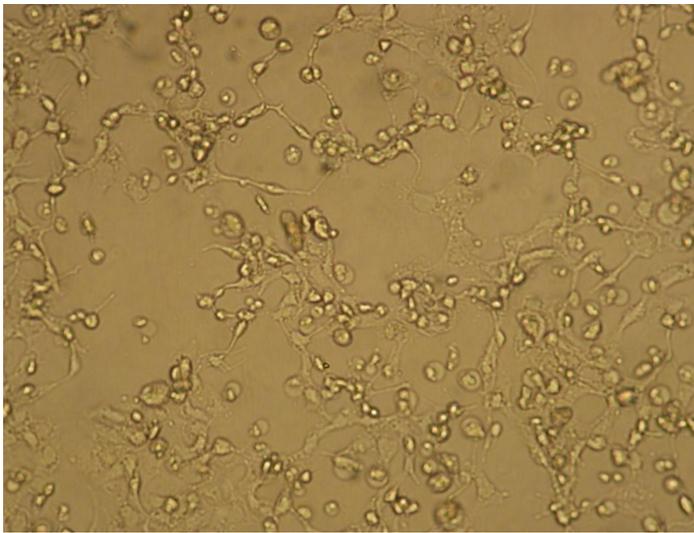
je ml einen niedrigeren Virusgehalt im Vergleich zu den Proben aus den anderen Organen.

#### ***4.6.1 Untersuchung der Tupferproben auf Virusgehalt mittels TH-1-Zellkulturen***

Von den 104 untersuchten Tupferproben entwickelte sich nach Inokulation auf TH-1-Zellen bei 79 nach ein bis zwei Tagen Inkubation ein ZPE. Die anderen 25 Proben blieben auch nach einmaliger Passage negativ. Chronologisch und morphologisch waren zeitliches Auftreten und Art der Veränderungen an den Zellen nicht von jenen zu unterscheiden, die bereits während der Untersuchung der aufbereiteten Organsuspensionen festgestellt werden konnten. Die Ergebnisse der Virusisolierungen aus den Tupferproben sind detailliert der Tabelle 12 (befindet sich im Anhang) zu entnehmen. Eine Übersicht zur Verteilung der positiven Proben (11 Tupfer aus Konjunktiva und je 34 Tupferproben aus Rachen und Kloake) auf die jeweiligen Entnahmestellen befindet sich in Tabelle 12 im Anhang.



**Abbildung 7: TH-1-Zellkultur nicht infiziert; Nativpräparat (100-fache Vergrößerung)**



**Abbildung 8: TH-1-Zellkultur drei Tage p.i. mit Isolat 402/Ni, Nativpräparat, 100fache Vergrößerung**

#### ***4.6.2 Quantitative Bestimmung des Virusgehaltes mittels Titration der gefundenen Isolate***

Von den zunächst qualitativ untersuchten 104 Tupferproben aus Konjunktiva, Rachen und Kloake konnte anschließend der Virusgehalt von 79 Proben quantitativ bestimmt werden. Die KID<sub>50</sub>-Werte je ml aller Titrationen von allen Schildkrötenspezies und allen Orten der Entnahme der Tupferproben enthält die Tabelle 13 im Anhang. Aus der tabellarischen Übersicht (Tabelle 5) ist zu entnehmen, dass deutliche Speziesunterschiede hinsichtlich der gelungenen / nicht gelungenen Virusnachweise nicht hervortreten. Erkennbar ist auch, dass sich die Virusgehalte je Tupfer relativ gleichmäßig auf die Spanne von 10<sup>2,1</sup> bis 10<sup>7,0</sup> KID<sub>50</sub> je ml verteilen (Tabelle 6).

**Tabelle 5: Häufigkeit der Virusisolierung mit Bezug zum Ort der Tupferprobenentnahme von 10 Spezies der Landschildkröten**

Spezies der Landschildkröten	Zahl der positiven / negativen Tupferproben aus		
	Konjunktiva	Rachen	Kloake
Griechische Landschildkröte <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	0 / 0	9 / 3	9 / 3
Maurische Landschildkröte <i>Testudo graeca iberica</i> / <i>T. g. terrestris</i>	8 / 0	16 / 0	16 / 0
Breitrandschildkröte <i>Testudo marginata</i>	2 / 0	7 / 1	7 / 1
Vierzehen-Landschildkröte <i>Astrochelys horsfieldii</i>	0 / 0	0 / 3	0 / 3
Indische Sternschildkröte <i>Geochelone elegans</i>	0 / 0	1 / 0	1 / 0
Pantherschildkröte <i>Geochelone pardalis</i>	1 / 1	1 / 1	1 / 1
Köhlerschildkröte <i>Geochelone carbonaria</i>	0 / 3	0 / 0	0 / 0
Strahlenschildkröte <i>Astrochelys radiata</i>	0 / 1	0 / 0	0 / 0
Seychellen-Riesenschildkröte <i>Dipsoschelys hololissa</i>	0 / 2	0 / 0	0 / 0
<b>Summen</b>	11 / 7	34 / 8	34 / 8

**Tabelle 6: Ergebnisse der Titrationsen von 77 Tupferproben aus Konjunktiva, Rachen und Kloake aller Schildkröten**

Spannen der Virusgehalte je Tupfer in $10^x$ KID <sub>50</sub> je ml	Zahl der Tupfer je Spanne mit Virusgehalt	% der Tupfer mit Virusgehalt von insgesamt 77 Tupfern
1.9 – 2.0	0	0
2.1 – 3.0	8	10,3
3.1 – 4.0	24	31,2
4.1 – 5.0	18	23,4
5.1 – 6.0	24	31,2
6.1 – 7.0	3	3,9
7.1 – 8.0	0	0
Summe bzw. %	77	100

#### **4.6.3 Versuche zur Virusisolierung aus Organproben in weiteren Zellkulturen**

In allen ebenfalls zur Virusisolierung aus Organproben eingesetzten Zellkulturen VH-2, HEF, HELZ und MDBK entwickelte sich weder in den Primär- noch in den Subkulturen ein mikroskopisch erkennbarer ZPE. Die VH-2-Zellkulturen wurden bei 28 °C inkubiert und zwei Wochen lang täglich auf die Entstehung eines ZPE untersucht. Während des gesamten Zeitraums war in den VH-2-Zellkulturen kein ZPE erkennbar. In den Hühnerembryo-Zellkulturen (HEF, HELZ) und in der Säugetierzellkultur (MDBK), welche bei 38 °C bebrütet wurden, entwickelte sich im Zeitraum von 14 Tagen kein ZPE. Somit müssen die genannten Zellkulturen als refraktär angesehen werden.

#### **4.7 Behandlung mit Chloroform und Kultivierung mit IUDR**

Alle untersuchten Isolate vermehrten sich nach Zugabe von Chloroform und bei Kultivierung mit IUDR ohne sichtbare Hemmung des ZPE. Bei der Titration von 5 Isolaten (Tabelle 7) zeigte sich kein deutlicher Titerverlust, so dass die Befunde für das Vorliegen eines unbehüllten RNS-Virus sprechen.

Als Kontrollen dienten für jedes der fünf Isolate eine unbehandelte Probe sowie ein 2004 isoliertes Herpesvirus Tgb.-Nr. 302/04 von einer Landschildkröte.

**Tabelle 7: Infektiositätstiter nach Chloroform-Behandlung und nach Kultivierung mit IUDR im Vergleich zur Kontrolle**

Tagebuch-Nr./ Organ	Infektiositätstiter in KID <sub>50</sub> je ml nach		
	Chloroform- Behandlung	Kultivierung mit IUDR	Nicht behandelte Kontrolle
1243/62 Gehirn	6,7	6,8	7,1
402/1 Niere	7,4	7,3	7,5
402/2 Zunge	7,0	7,1	7,3
1443/1 Gehirn	6,5	6,8	7,1
1243/37 Zunge	6,8	7,0	7,1
Positiv-Kontrolle <sup>1</sup>	0,8	0,8	5,2

<sup>1</sup>Herpesvirus Tgb.-Nr. 302/04

#### 4.8 Einfluss von Aktinomycin D auf die Virusvermehrung

Durch die Zugabe von Aktinomycin D (1 µg/ml) zum Erhaltungsmedium wurde die Vermehrung der Isolate 1243/62 Gehirn, 402/1 Niere, 402/2 Zunge, 1443/1 Gehirn, 1243/37 Zunge in TH-1-Kulturen nicht gehemmt.

Die Titer der behandelten Isolate ergaben nur geringfügige Abweichungen zu den unbehandelten Isolaten. (Tab. 8).

Die Zugabe von Aktinomycin D zur unbeimpften Zellkultur führte nicht zu mikroskopisch erkennbaren Veränderungen in dieser.

**Tabelle 8: Titer in TH-1-Zellkultur nach Zugabe von Aktinomycin D**

Tagebuch-Nr. / Organ	Infektiositätstiter in 10 <sup>x</sup> KID <sub>50</sub> je ml nach	
	Aktinomycin D	Nicht behandelte Kontrolle
1243/62 Gehirn	6,8	7,1
402/1 Niere	7,0	7,5
402/2 Zunge	6,7	7,3
1443/1 Gehirn	6,8	7,1
1243/37 Zunge	6,7	7,1
Positiv-Kontrolle <sup>1</sup>	0,7	5,2

<sup>1</sup>Herpesvirus Tgb.-Nr. 302/04

#### 4.9 Prüfung der pH-Stabilität

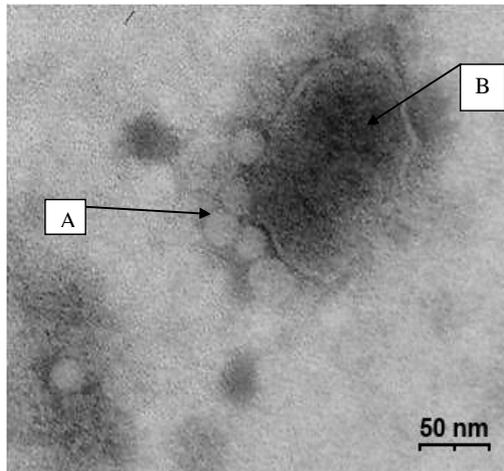
Die Titration der bei unterschiedlichen pH-Werten für 3 Stunden bei 28 °C inkubierten Proben zeigte bis zu einem pH-Wert von 7,0 keinen erkennbaren Titerverlust. Nach Inkubation des Mediums mit einem pH-Wert von 12 trat eine deutliche Hemmung der Virusvermehrung auf (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Prüfung der pH-Stabilität ausgewählter Isolate**

Isolat-Nr. aus Organ	Infektiositätstiter in $10^x$ KID <sub>50</sub> je ml nach Einwirkung von				
	pH = 3	pH = 5	pH = 7	pH = 12	Kontrolle
Tgb.-Nr. 1243/37 Zunge	6,5	6,5	6,5	2,5	7,1
Tgb.-Nr. 402/1 Niere	7,0	7,0	7,0	3,0	7,3

#### 4.10 Elektronenmikroskopische Untersuchung

Beide elektronenmikroskopisch nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure untersuchten Isolate (1243/37 Zu und 402/1 Ni) stellten sich morphologisch gleich dar. Die sphärischen Viruspartikel hatten einen Durchmesser von 20-25 nm. Etwa 95 % aller Partikel erschienen gut kontrastiert, allerdings war die Kapsomerenstruktur nur undeutlich erkennbar (Abbildung 9).



**Abbildung 9: Elektronenmikroskopische Darstellung von Picornavirus-ähnlichen Partikeln (Pfeile) nach Negativkontrastierung mit Phosphorwolframsäure**

A: gefundene Partikel

B: Zelldetritus

#### **4.11 Virusneutralisationstests**

Im Virusneutralisationstest wurden 19 Seren verschiedener adulter Landschildkrötenarten auf Antikörper gegen das eigene Isolat mit der Tgb.-Nr.1243/37 Zu aus einer Maurischen Landschildkröte getestet. In der folgenden Tabelle 10 sind die Titer als  $\log_2$ -Werte der Verdünnungsstufen der einzelnen Blutserumproben gegen das Testvirus-Isolat dargestellt. Gemessen wurden Antikörpertiter zwischen  $\log_2 = 3$  (1:8) und  $\log_2 = 8$  (1:256). Nur zwei der getesteten Seren hatten einen Titer von  $\log_2 < 2$  (< 1:4), der als negativ anzusehen ist. In allen anderen 17 Blutserumproben von insgesamt sieben Spezies adulter Landschildkröten konnten virusneutralisierende Antikörper gemessen werden (siehe Tab. 10).

**Tabelle 10: Im Virusneutralisationstest mit Isolat 1243/37 Zu bestimmte Antikörper in Blutserumproben**

Tagebuch-Nr.	Spezies	Geschlecht	Titer*
Z-06	<i>Testudo marginata</i>	w	5
OD-06	<i>Testudo marginata</i>	m	< 2
GI-06	<i>Testudo marginata</i>	w	4
A-06	<i>Testudo graeca</i>	w	5
S-06	<i>Testudo graeca</i>	w	3
L-06	<i>Testudo graeca</i>	m	8
R-06	<i>Testudo graeca</i>	w	3
P-06	<i>Testudo graeca</i>	m	8
Qu-06	<i>Testudo h. boettgeri</i>	m	< 2
Joh-06	<i>Testudo h. boettgeri</i>	m	3
Iv-06	<i>Testudo h. boettgeri</i>	w	4
B-06	<i>Testudo h. boettgeri</i>	w	4
E-06	<i>Geochelone elegans</i>	w	5
M-06	<i>Geochelone elegans</i>	m	4
K-06	<i>Geochelone sulcata</i>	m	6
ET-06	<i>Aldabrachelis gigantea</i>	m	4
881/1	<i>Geochelone carbonaria</i>	m	3
881/2	<i>Geochelone carbonaria</i>	w	4
881/3	<i>Geochelone carbonaria</i>	w	5

\* Alle Titerangaben in  $\log_2$

Auf eine statistische Analyse der numerischen Differenzen der nachgewiesenen Antikörpertiter wurde wegen der relativ geringen Zahl der Blutserumproben und wegen deren Herkunft aus sieben Spezies der Landschildkröten verzichtet.

Über die Spezifitätsgrenze von virusneutralisierenden Antikörpern nach Infektion mit Picornavirus ist bei Schildkröten bisher noch nichts bekannt. Deshalb werden hier alle Antikörpertiter wie abgelesen mitgeteilt.

## 4.12 Sequenzierung des Genoms des Isolats mit der Tagebuchnummer

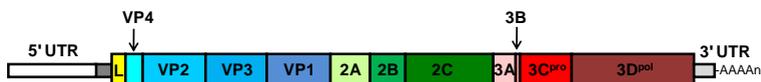
### 1243/37 Zu

Durch die Sequenzierung des nahezu gesamten Genoms des Isolates 1243/37 Zu konnten die Ergebnisse der bisherigen eigenen Untersuchungen zu den biologischen Eigenschaften bestätigt werden. Darüber hinaus erlauben die Sequenzierungsdaten eine Zugehörigkeit des sequenzierten Isolats zur Familie *Picornaviridae*.

Die Ergebnisse der Genomsequenzierung sowie abgeleitete Aminosäuresequenzen befinden sich im Anhang (s.S. 89).

#### 4.12.1 Genomorganisation des Isolats 1243/37 Zu

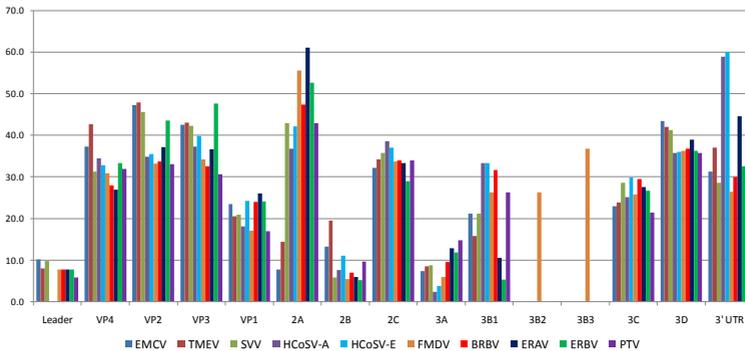
Die Genomorganisation des Isolats 1243/37 Zu ist in Abbildung 10 dargestellt. Der weiße Bereich am 5' UTR-Ende ist ein bisher noch nicht sequenzierter Teil. Die Organisation der Proteine ist bei allen Mitgliedern der *Picornaviridae* gleich. Das Polyprotein teilt man in drei Bereiche ein. VP1-VP4 steht für die Strukturproteine. In der Mitte des Polyproteins befinden sich Nichtstrukturproteine, bezeichnet als 2A-C, wobei 2A eine Protease ist. Die Funktion dieser Nichtstrukturproteine besteht in der Anpassung des Virus an den Wirtsstoffwechsel. In der Region 3A-3D werden enzymatisch aktive Komponenten gebildet und einige Nichtstrukturproteine. So entsteht die für Picornaviren typische L-4-3-4 Organisation.



**Abbildung 10:** Genomorganisation des sequenzierten Isolates Tgb-Nr: 1243/37 Zu

#### 4.12.2 Vergleich der Aminosäuresequenzen des Isolates 1243/37 Zu mit anderen Picornaviren

Die Abbildung 11 zeigt einen Vergleich der Aminosäuren des sequenzierten Isolates 1243/37 Zu mit anderen bekannten Picornaviren. Im Bereich des Leader-Proteins, sowie im Abschnitt 2B und 3A sieht man eine sehr geringe Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen mit dem Isolat 1243/37 Zu. Bei den anderen verglichenen Abschnitten reichen die Übereinstimmungen von 8-62%.



**Abbildung 11: Prozentuale Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen des Isolats 1243/37 Zu mit anderen Picornaviren**

EMCV: Encephalomyokarditis Virus

TMEV: Theiler`s murine encephalomyelitis Virus

SVV: Seneca valley Virus

HCoV-SV-A: Human Cosavirus A

HCoV-SV-E: Human Cosavirus E

FMDV: Food-and-Mouth Disease Virus

BRBV: Bovines Rhinitis B Virus

ERAV: Equines Rhinitis A Virus

ERBV: Equines Rhinitis B Virus

PTV: Porcine Teschovirus

#### ***4.12.3 Einordnung des sequenzierten Isolates 1243/37 Zu in den phylogenetischen Stammbaum mittels Midpoint-rooted Neighbor-joining***

##### ***Methode***

In Abbildung 12 und 13 ist die Einordnung des gefundenen Isoaltes in den phylogenetischen Stammbaum zu sehen. Die Vergleiche der Aminosäuresequenzen mit denen bereits bestehender Genera der Familie der Picornaviridae wurden mit Hilfe der Midpoint-rooted Neighbor-joining Methode durchgeführt. In Abbildung 12 sieht man den Vergleich und die Einordnung über das P1 Kapsid. In Abbildung 13 erfolgte die Einordnung über den Vergleich der 3-D Polymerase. Man kann anhand dieser Vergleiche sehen, dass das gefundene und sequenzierte Isolat 1243/37 Zu keine direkten Verwandtschaftsverhältnisse zu bereits bestehenden Genera aufweist. Dies bedeutet, dass es sich bei dem isolierten Virus um ein neues Genera

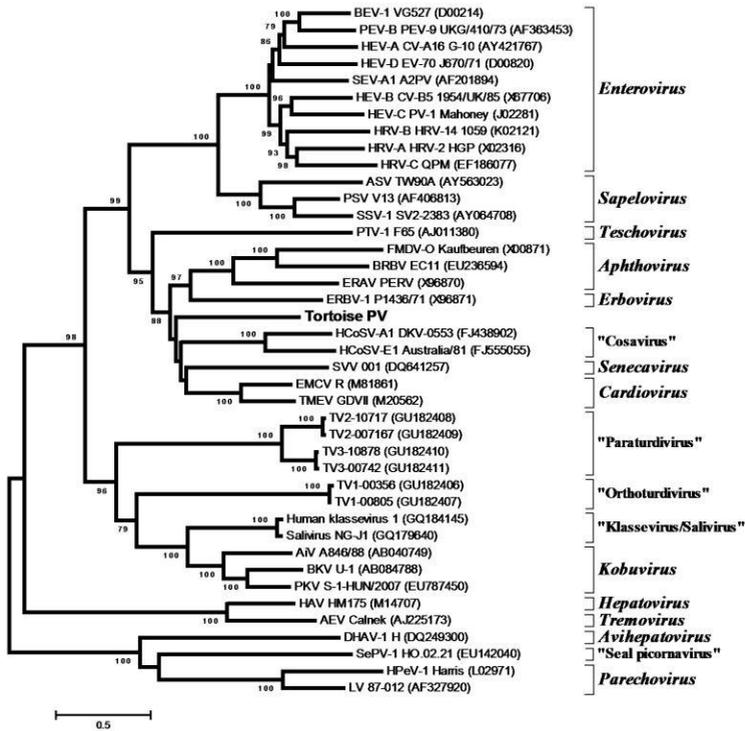


Abbildung 12: Vergleich und Einordnung des Isolates 1243/37 Zu (Tortoise PV) anhand des P1 Kapsids mit Hilfe der midpoint-rooted Neighbor-joining Methode in den phylogenetischen Stammbaum.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Freundlicherweise von Herrn Nick J. Knowles zur Verfügung gestellt.

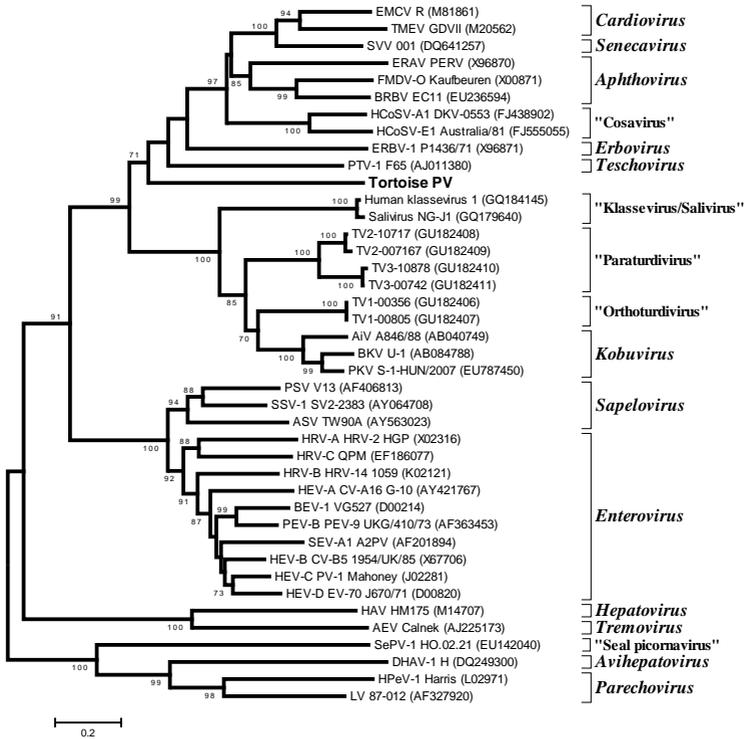


Abbildung 13: Vergleich des Isolates 1243/37 Zu (Tortoise PV) anhand der 3-D Polymerase mit Hilfe der midpoint-rooted neighbor-joining Methode und Einordnung in den phylogenetischen Stammbaum.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Freundlicherweise von Herrn Nick Knowles zur Verfügung gestellt.

## 5 Diskussion

Seit einigen Jahren wird von Schildkrötenzüchtern häufig das Problem der juvenilen Panzererweichung beschrieben. In diesen neueren Krankheitsfällen sind die Tiere noch sehr jung, zeigen einen weichen Panzer. Es besteht eine hohe Mortalitätsrate bei einzelnen, aber nicht bei allen Arten der Landschildkröten. Die Klärung der Ursache(n) für diese neuartige Erkrankung war der Ausgangspunkt für die durchgeführten eigenen Untersuchungen, die in dieser Arbeit beschrieben werden. Es zeigte sich sehr schnell, dass sich bei allen erkrankten und gestorbenen Jungtieren ein zytopathisches Agens in TH-1-Zellkultur nachweisen ließ, welches aufgrund seines Verhaltens große Ähnlichkeit mit den von MARSCHANG (2000) bereits häufig isolierten „Virus X“-Isolaten zeigte.

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Isolate führten in TH-1-Zellkulturen innerhalb weniger Tage zu einer nahezu kompletten Zellyse. Die wenigen verbliebenen Zellen rundeten sich teilweise ab, andere wurden spindelförmig. Die nachgewiesene Stabilität gegenüber Chloroform, IUDR und Aktinomycin D ließ den Schluss zu, dass es sich um ein unbehülltes, einzelsträngiges RNS-Virus handelt. Elektronenmikroskopisch gelang es, kleine, runde Partikel (20-25 nm) mit undeutlicher Kapsomerenstruktur darzustellen. Aufgrund der Eigenschaften in Zellkultur und der Morphologie lässt sich das gefundene Agens als Picornavirus-ähnlich ansprechen. Als nächster Schritt erfolgte eine Untersuchung hinsichtlich der pH-Stabilität. Dies erlaubte eine Einteilung in die Gruppe der säurestabilen aber alkalilabilen Picornaviren. Zu dieser Gruppe gehören die Genera der *Enterovirus*, *Parechovirus*, *Hepatovirus* und *Cardiovirus* (STANWAY et al., 2005). Die anschließend erfolgte Sequenzierung des gesamten Genoms eines Isolats (1243/37 Zu) konnte die eigenen in Zellkulturen erhobenen Ergebnisse bestätigen, was dessen Zuordnung zur Familie *Picornaviridae* ermöglicht. Bisher gelang jedoch noch keine Zuordnung des sequenzierten Isolats zu einem der bestehenden Genera. Interessanterweise konnte aus allen Jungtieren mit den beschriebenen Veränderungen am Panzer dieses Virus isoliert werden. Welche Rolle die eigenen Isolate bei adulten Tieren spielen, ist jedoch unklar, im vorliegenden Fall waren bis auf zwei Tiere alle Adulten ohne eine klinische Symptomatik. Bisher befindet sich in der Literatur keine Beschreibung einer Virusätiologie im Zusammenhang

mit juveniler Panzererweichung. Im Gegenteil, es werden bis heute Fehler in Haltung und Ernährung und dadurch hervorgerufene Stoffwechselstörungen ursächlich für Panzererweichungen vermutet. Deshalb sind im Literaturteil diejenigen Faktoren ausführlich referiert, die gemäß Angaben der Autoren zu Veränderungen des Panzers führen sollen. In der Literatur findet man mehrere Beschreibungen von Panzerdeformationen und -erweichungen von HAUSER et al. (1977) bei importierten Seychellen-Riesenschildkröten im Zoo Zürich. FRYE (1991) beschreibt ein vermehrtes Auftreten dieser vermutlich stoffwechselbedingten Störungen vor allem bei herbivoren Landschildkröten. Auch HÄFELI und ZWAART untersuchten im Jahr 2000 zehn juvenile Landschildkröten mit stark erweichtem Panzer hinsichtlich ihrer Todesursache. Sie vermuteten als Ursache für diese Veränderungen Erkrankungen der Nieren und einen Befall mit Endoparasiten.

Die Ergebnisse meiner untersuchten Tiere sind pathologisch-anatomisch sowie pathohistologisch sehr ähnlich denen von HÄFELI und ZWAART (2000). Diese beiden Autoren konnten in ihren Untersuchungen Fehler in Haltung und Ernährung nahezu ausschließen. Sie beschrieben ebenfalls bei den Jungtieren eine Grauverfärbung des Panzers mit vollständigem Stabilitätsverlust. Der Panzer hatte seine Stabilität fast vollständig verloren und gab schon auf leichten Druck mit dem Finger nach. Veränderungen der Kopfform oder des Schnabels, wie man bei rachitischen Tieren oftmals zu sehen bekommt, waren aber nicht vorhanden. Die Knochen des Skeletts sowie des Panzers waren sehr weich und leicht zu zerschneiden. In der pathologischen Untersuchung war eine Dilatation der Harnsäcke auffallend, auch konnte bei einigen Tieren eine Vergrößerung der Nieren festgestellt werden. Auch histopathologisch stellte sich ein ähnliches Bild zu den von mir untersuchten Tieren dar. HÄFELI und ZWAART (2000) beschrieben außerdem, dass die Knochenmineralisierung fast vollständig fehlte, es waren nur einzelne Knochenspannen im feinfaserigen Bindegewebe zu finden, das embryonalen Strukturen glich. Osteoidsäume fehlten, ebenso konnten auch bei ihren Tieren nur wenige Osteoblasten und Osteoklasten gefunden werden. Auch zeigte sich bei den von HÄFELI und ZWAART untersuchten Tieren eine nicht

durchgängige Kompakta der langen Röhrenknochen sowie Bindegewebe, welches zapfenförmig in die Markhöhle reicht.

Weitere Knochenstoffwechselstörungen werden in der Literatur unter der Bezeichnung *Metabolic bone disease* zusammengefasst und im Einzelnen mit den Krankheitsbildern einer Rachitis, Osteodystrophia fibrosa und Osteoporose beschrieben (DÄMMRICH, 1967; MADER, 2006). Als Auslöser werden verschiedene Faktoren beschrieben, die zumeist mit Fehlern in der Haltung und Ernährung einhergehen. Genannt werden immer wieder ein Vitamin D<sub>3</sub>-Mangel, eine Unterversorgung mit UV-B-Licht, ein ungünstiges Kalzium-Phosphor-Verhältnis in der Nahrung, Veränderungen der Parathyreoidea, ein Befall mit *Hexamita parva*, sowie Nierenerkrankungen verschiedener Ätiologie.

Wenn die genannten einzelnen Faktoren näher betrachtet werden, wird schnell klar, warum diese zu so starken Veränderungen im Skelettsystem führen können. Eine unzureichende Bestrahlung der Tiere mit UV-B-Licht verursacht eine ungenügende Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese. Dadurch können diese Tiere nur unzureichend Kalzium aus der Nahrung aufnehmen. In der alleinigen Terrarienhaltung ist meist keine adäquate Versorgung von UV-B-Strahlung gegeben. Eine Nahrungssubstitution mit Vitamin D<sub>3</sub> zum Ausgleich findet häufig nicht statt.

Ein ebenso wichtiger Faktor bei der Ernährung von herbivoren Landschildkrötenarten ist ein Kalzium-Phosphor-Verhältnis in der Nahrung im Verhältnis von 2:1. Bestehen diese Mängel über einen längeren Zeitraum, kann dies zur Ausbildung des alimentären sekundären Hyperparathyreoidismus führen. Die dadurch entstehende vermehrte Sekretion von Parathormon, um den niedrigen Blut-Kalziumspiegel zu erhöhen, führt zu einer Entkalkifizierung der Knochen. Störungen der Resorption können auch durch länger bestehende bakterielle Infektionen der Nieren hervorgerufen werden. Jungtiere sind besonders empfindlich für diese Imbalancen im Stoffwechsel und können relativ schnell das Bild einer Rachitis ausbilden, welche mit Panzererweichung als Leitsymptom einhergeht.

In dem hier untersuchten Fall stellt es sich jedoch etwas anders da. Alle erhaltenen und untersuchten jungen Landschildkröten sowie Tupfer- und Blutproben stammen aus einem privaten Bestand. Der Züchter dieser Tiere verzeichnete seit

etwa zwei Jahren hohe Verluste bei einzelnen Arten. In seinem Bestand werden europäische Arten sowie verschiedene Arten tropischer Landschildkröten gehalten. Die Tiere sind in unterschiedlichen Gewächshäusern mit angrenzenden Außengehegen untergebracht. Bei den europäischen Arten werden jedoch die Griechischen, Maurischen und Breitrandschildkröten in einem Gehege gehalten, während die Russischen Landschildkröten getrennt untergebracht sind. In den Gewächshäusern werden Sonnenplätze mit ausreichender UV-B-Strahlung durch Lampen angeboten. In den Außengehegen sind verschiedene Futterpflanzen vorhanden, die zum einen der Nahrungsaufnahme und zum anderen als Schattenspender dienen. Die tropischen Arten sind in den kühleren Monaten in Gewächshäusern untergebracht, die komplett mit Heizung und Licht ausgestattet sind. Die Fütterung besteht im Sommer aus diversen Gräsern, Wildkräutern und Heu. In den Wintermonaten wird bei allen europäischen Arten eine Winterruhe durchgeführt. Um die Gefahr eines hochgradigen Parasitenbefalls zu minimieren, wird täglich der Kot aus den Gehegen entfernt. Sammelkotproben werden regelmäßig auf einen Parasitenbefall untersucht und bei Bedarf wird eine antiparasitäre Therapie durchgeführt. Aufgrund des vorgefundenen Haltungs- und Fütterungsregimes in diesem Zuchtbestand können Fehler in der Haltung und Ernährung mit ziemlich großer Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die betroffenen Schildkröten sind zum Zeitpunkt der Panzererweichung noch sehr jung. In einem Alter von 6-8 Wochen erweicht der Panzer, die Nahrungsaufnahme wird eingestellt und die Tiere sterben. Bei etwas älteren Tieren, die nicht innerhalb der ersten Lebenswochen sterben, hat sich gezeigt, dass sie noch zusätzlich Anzeichen einer respiratorischen Erkrankung und eine Konjunktivitis aufweisen. Diese Tiere sind trotz antibiotischer Therapie und Flüssigkeitssubstitution gestorben oder wurden aufgrund des schlechten Allgemeinbefindens euthanasiert. Neben den Mängeln in Haltung und Ernährung der Tiere ist ein Parasitenbefall durch *Hexamita parva*, wie er schon durch SCHNELLER und PANTCHEV (2008) als Ursache einer Panzererweichung diskutiert wurde, immer in Betracht zu ziehen. Diese normalerweise im Darm vorkommenden einzelligen Parasiten können über die Kloake und Harnwege in die Nieren gelangen und dort zu Nephrosen führen. Da die Niere ein wichtiges

Organ für die Vitamin D<sub>3</sub>-Synthese ist, kommt es bei schwerwiegenden Erkrankungen der Nieren auch zu einer gestörten Kalziumresorption aus dem Darm und dadurch zum Weichwerden des Panzers. Es konnten aber in keiner der von mir untersuchten Kot- und Harnproben Hexamiten nachgewiesen werden. In den nativen Kotuntersuchungen konnten zwar geringgradig Flagellaten sp., Balantidien und *Nyctotherus* nachgewiesen werden, jedoch sind diese bei einem Vorkommen in geringem Maße nicht als pathogen anzusehen. Keines der seziierten Tiere wies Zeichen einer Enteritis auf, welche für ein Malabsorptionssyndrom ursächlich sein könnte.

Weil nahezu alle Jungtiere der Spezies *Testudo graeca* und *Geochelone elegans* starben und die Jungtiere der anderen Spezies, welche unter denselben Bedingungen aufwuchsen, keinerlei Krankheitssymptome aufweisen, könnte dies für ein virales Geschehen mit unterschiedlichen Spezies-Empfänglichkeiten stehen. Ähnliche Beobachtungen machten auch schon KABISCH und FROST (1994) beim Auftreten von Herpesvirus-Infektionen europäischer Landschildkröten. Hierbei wird eine erhöhte Empfindlichkeit nur bei Griechischen und Breitrandsschildkröten beschrieben.

Virusbedingte Erkrankungen bei Reptilien sind schon lange bekannt und können immer wieder mit großen Verlusten in Beständen einhergehen. Allerdings sind alle bisher gefundenen Viren bei Landschildkröten mit Erkrankungen des Respirations- und oberen Digestionstrakts assoziiert. Hier spielen vor allem Herpes- und Ranaviren eine große Rolle. Herpesviren werden seit den 80er Jahren bei Landschildkröten häufig nachgewiesen. Sie wurden im Zusammenhang mit Rhinitis, Stomatitis, Glossitis, Konjunktivitis und in Einzelfällen auch mit Enteritiden (LANGE et al., 1989; KABISCH und FROST, 1994; STEINER, 2010) in Verbindung gebracht. Ähnliche Symptomatiken zeigten Landschildkröten, aus denen Ranaviren isoliert werden konnten.

Die von MARSCHANG (2000) zahlreich gefundenen Virus X-Isolate wurden ebenfalls im Zusammenhang mit diphtheroid-nekrotisierender Stomatitis und Pharyngitis, Konjunktivitis, Rhinitis, Pneumonie, Enteritis und Aszites bei adulten Tieren verschiedenster Spezies gefunden. Interessanterweise konnten durch MARSCHANG und SCHNEIDER (2002) bei wildlebenden, adulten, Maurischen

Landschildkröten in der Türkei neben Antikörpern gegen das Herpesvirus Serotyp 2, Antikörper gegen ein Reovirusisolat und ein „Virus X“-Isolat gefunden werden. Virus X scheint also ebenso wie Herpesviren bei den wildlebenden Populationen vorzukommen. Inwiefern es dort zu Erkrankungen führt, ist noch unklar.

Im Rahmen meiner Untersuchungen konnte ich bei adulten klinisch symptomfreien Tieren Antikörper gegen das Isolat TgB-Nr. 1243/37 zu nachweisen. Die Höhe der nachgewiesenen Titer war jedoch sehr unterschiedlich. Es konnte kein Zusammenhang zwischen Titerhöhe und Erkrankung der Jungtiere gefunden werden, da Antikörpernachweise auch bei den Arten möglich waren, bei denen es vorher keine Jungtiererkrankung gab. So zeigte sich bei zweien der untersuchten Maurischen Landschildkröten ein sehr hoher Titer mit 1:256, jedoch lagen die meisten nachgewiesenen Titer zwischen 1:8 bis 1:32. Zwei Tiere wiesen einen Titer  $< 2$  auf. Da über die Spezifitätsgrenze der virusneutralisierenden Antikörper während einer Infektion mit Picornaviren bei Landschildkröten noch nichts bekannt ist, lässt sich schwer sagen, ab welchem Titer die Tiere als positiv anzusehen sind. Ebenso ungewiss ist bisher, ob und ab wann der Titer nach einer Infektion wieder abfällt.

Aufgrund der Ergebnisse meiner Untersuchungen erscheint eine virale Ätiologie, zumindest aber die Beteiligung eines Virus im Sinne eines Ko-Faktors an der Entstehung des Krankheitsbilds der juvenilen Panzererweichung wahrscheinlich.

Diese Aussage stützt sich auf folgende Befunde:

- eine ursächliche Beteiligung von Fehlern bei der Haltung und Ernährung am Krankheitsgeschehen konnte ausgeschlossen werden
- eine genetische Komponente kann ausgeschlossen werden, weil von denselben Eltern früher gesunde Nachkommen erzeugt wurden
- pathogene bakterielle und mykotische parasitäre Infektionen können durch eigene Untersuchungen nicht nachgewiesen werden
- Parasiten im Panzer waren weder makroskopisch noch histologisch im erweichten Panzer zu erkennen
- pathohistologische Befunde sprechen für ein infektiöses Geschehen ohne Beteiligung von Bakterien und Pilzen

- aus mehreren inneren Organen von allen juvenilen Landschildkröten mit dem klinischen Bild einer Panzererweichung konnte ein zytopathogenes Virus isoliert werden
- ein ähnliches (oder gar identisches) Virus wurde in früheren Untersuchungen aus juvenilen Landschildkröten mit Störungen der Hornbildung des Panzers nicht isoliert. Solche Tiere stammten stets aus Beständen mit erheblichen Defiziten in Haltung und Ernährung.

Den genannten Gesichtspunkten kommt eine große Bedeutung bei der Aussage zur viralen Ätiologie der juvenilen Panzererweichung zu. Dennoch muss derzeit konstatiert werden, dass die Henle-Kochschen Postulate noch nicht erfüllt wurden.

Für die Zukunft ist es zum einen sicherlich interessant, weitere Untersuchungen durchzuführen, um zu sehen, ob wirklich alle gefundenen Isolate untereinander übereinstimmen oder ob es verschiedenen Sero- oder Genotypen gibt, die sich vielleicht wie die Herpesvirus-Serotypen bestimmten Arten von Landschildkröten zuordnen lassen.

Es ist auch noch erforderlich, die Henle-Kochschen Postulate zu erfüllen, um die eigenen Isolate als weitere mögliche Ursache der juvenilen Panzererweichung zu bestätigen.

## 6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klärung, ob es andere, als die bisher bekannten Ursachen für das Krankheitsbild juvenile Panzererweichung gibt. Für meine Untersuchungen habe ich einen Betsand ausgewählt, welcher seit einiger Zeit Probleme mit juveniler Panzererweichung hatte. In diesem Bestand waren nur Jungtiere der Spezies *Testudo graeca* und *Geochelone elegans* betroffen.

Nicht erkrankt waren juvenile Landschildkröten der Spezies *Testudo hermanni*, *Testudo marginata* und *Agronemys horsfieldii*. In diesem Schildkrötenbestand konnte ich Fehler in Haltung und Fütterung mit großer Sicherheit ausschließen. Es wurden von mir zunächst acht juvenile Landschildkröten (sieben *Test. graeca* und eine *G. elegans*) untersucht. Diese Tiere hatten alle einen sehr weichen Panzer, welcher auf leichten Druck der Finger deutlich nachgab. In der Sektion wurden jedem Tier acht Organe (Gehirn, Zunge, Herz, Lunge, Leber, Niere, Milz und Darm) für die virologische und mikrobiologische Untersuchung entnommen.

Die adulten Tiere verschiedener Spezies wurden ebenfalls klinisch untersucht und ich habe insgesamt 104 Tupferproben (18 Konjunktival, 43 Rachen-, 43 Kloakentupfer) für die virologische Untersuchung in Zellkultur entnommen. Ich habe folgende Zelllinien eingesetzt: TH-1 (*Terrapene heart cells*), VH-2 (*Russel's viper heart cells*) HEF- (*Hühnerembryofibroblasten*), HELZ-Kulturen, sowie auf MDBK (*madin darby bovine kidney*). Zusätzlich habe ich noch von 19 adulten Tieren Blutserumproben im Virusneutralisationstest auf die Bildung neutralisierender Antikörper untersucht.

Bei allen 64 Organproben und bei 79 Tupferproben konnte ein zytopathischer Effekt in der TH-1 Zellkultur beobachtet werden. Zwei bis drei Tage post infectionem begannen sich die Zellen teilweise abzurunden und es entstanden Lücken im Zellrasen. Nach etwa sieben Tagen war der komplette Zellrasen lytisch. In den anderen eingesetzten Zelllinien war kein zytopathischer Effekt zu sehen. Für eine weitere Charakterisierung wurden folgende fünf Isolate mit den Tagebuchnummern 402/1; 402/2; 1243/37; 1243/62; 1443/1 ausgewählt. Diese habe ich hinsichtlich ihrer Vermehrungsfähigkeit in Anwesenheit von Chloroform, IUDR, Aktinomycin D überprüft.

Außerdem wurden zwei Isolate hinsichtlich pH-Stabilität untersucht. Diese beiden Isolate wurden auch elektronenmikroskopisch untersucht. Ein Isolat (1243/37 Zu) wurde sequenziert.

Das Virus erwies sich als chloroformstabil, auch die Zugabe von IUDR und Aktinomycin D zum Kulturmedium führten nicht zu einer Hemmung der Virusvermehrung. Bei der Prüfung der pH-Stabilität zeigte sich bei pH=3 bis pH=7 keine Hemmung der Virusvermehrung, wohingegen ein pH=12 zu einem deutlichen Verlust der Infektiosität führte. Im Elektronenmikroskop stellten sich die Viruspartikel als klein (20-25nm), rund und mit undeutlicher Kapsomenstruktur dar.

Die Gesamtheit der eigenen Ergebnisse zeigt, dass aus den erkrankten juvenilen Landschildkröten in großer Häufigkeit ein bisher nicht näher beschriebenes, kleines, unbehülltes, säurestabiles aber alkalilabiles, einzelsträngiges RNS-Virus nachgewiesen werden konnte. Aufgrund der biologischen, physiko-chemischen und morphologischen Eigenschaften wird eine Zugehörigkeit der Isolate zur Familie *Picornaviridae* postuliert.

Die durchgeführte Sequenzierung des Genoms eines ausgewählten Isolats konnte diesen Verdacht bestätigen. Es läßt sich auch aufgrund der Sequenzierungsdaten der Familie der *Picornaviridae* zuordnen, jedoch noch nicht in eines der bestehenden Genera.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte somit erstmalig ein Virus aus zwei Spezies juveniler Landschildkröten mit Panzererweichung isoliert und charakterisiert werden, welches alle Eigenschaften der Viren der Familie *Picornaviridae* besitzt und sehr wahrscheinlich einem neuen Genus innerhalb dieser Familie zugeordnet werden kann.

Im Virusneutralisations-Test konnten in 17 der 19 untersuchten Blutplasmaproben von adulten Landschildkröten aus sieben verschiedenen Spezies Antikörpertiter in einer Höhe von  $\log_2 = 3$  bis  $\log_2 = 8$  nachgewiesen werden. Nur 2 Tiere wiesen einen Titer von  $\log_2 < 2$  auf. Die adulten Tiere waren bis auf eine Pantherschildkröte (*Geochelone pardalis*) mit leichter Konjunktivitis und eine Indische Sternschildkröte (*Geochelone elegans*) mit Rhinitis klinisch völlig unauffällig.

## 7 Summary

### **Isolation and charakterisation of a cytopathogenic agens from different tortoise species in combination with juvenile shell-softening**

The aim of this work is to find more than the common possibilities for shell-softening in juvenile tortoise. All of the examined tortoises are from the same breeder. Shell softening was only displayed in juvenile tortoise of two species: *Testudo graeca* and *Geochelone elegans*. The other juveniles from the species *Testudo hermanni*, *Testudo marginata* und *Agronemys horsfieldii* in this stock did not show any clinical symptoms. Already known mistakes in keeping and feeding or bacterial, fungal and parasitic agents could be excluded as a reason for this juvenile shell softening.

From 34 throat, 34 cloacal and 11 conjunctival swabs from adult tortoise without clinical signs and from the organ samples (brain, tongue, lung, heart, liver, kidneys and spleen) of 8 died juvenile tortoise with shell softening and rachitis-like symptoms I found in TH-1 cell culture incubated at 28°C a cytopathogenic agent. No cytopathic effect was found in other used cell lines: VH2, chicken embryo fibroblast, chicken embryo liver cells and Madin Darby bovine kidney cells. The next step was to characterize this “new” founded virus more closely.

Therefore we used from 49 adult and 8 juvenile tortoise 104 swabs and 64 organ samples. All of them lived at the same breeder. All swab samples and the 19 blood samples are taken from the adults and the organ samples are from died juvenile tortoise with shell softening. The 19 citrat-blood samples were testet in the virus neutralization test against the isolate 1243/37 Zu.

Clinical signs could be found in juvenile *Testudo graeca* and *Geochelone elegans*, all of them displayed a very soft shell. Juvenile tortoises from other species in the same location remained completely healthy and free of clinical signs. The suitability for virus isolation was tested in different cell cultures TH-1, VH-2, MDBK, CEF und CELZ. All of the 64 organ samples from brain, tongue, lung, heart, liver, kidney, spleen and intestine and 79 from the 104 swab samples I found two till three days post infectionem a cytopathic effect only in the TH-1 cell line. The cell monolayer was nearly completely destroyed. All other inoculated

cell cultures remained free of CPE during the total incubation period of two weeks. All tested isolates are resistant to chloroform treatment. The cultivation of the isolates in the presence of 5-iodo-2'-desoxyuridine and actinomycin D had no deleterious effect on the cytologic morphology. All results indicate that this cytopathogenic agent is an unenveloped, single stranded RNA virus. In the electronmicroscopy founded partikels were very small (20-25 nm) unenveloped, spherical shaped particles with an icosahedral capsid. The virus replication was stable at a range of pH = 3 to pH = 7, and at a pH of 12 a drastically reduced infectivity was detected.

All results of the own examinations indicate that I isolated from all organ samples of juvenile tortoise with shell softening a very small, unenveloped acid-stabil single-stranded RNA virus.

Based on the biological, physic-chemical and morphological characteristics I postulate that these isolates are a member of the family *Picornaviridae*. The results of sequencing of one isolate provide evidence for the incorporation as a member of the family *Picornaviridae*. At the moment, it is not possible to place this isolate in any of the existing genera of the family *Picornaviridae*.

I can say that we found in this work a new virus in two different species of tortoise with shell softening which has all attributes to be a member of the family *Picornaviridae*.

For the virus neutralisation test I took from 19 adult tortoise (seven different species) citrate blood samples. In 17 from 19 citrat blood samples I had titres ranging from  $\log_2 = 2$  bis  $\log_2 = 8$ . Only two of them had a titer of  $\log_2 < 2$ .

Only two adult tortoises have clinical symptoms. One *Geochelone pardalis* with conjunctivitis and one *Geochelone elegans* with rhinitis.

## 8 Literaturverzeichnis

**AHNE, W. und NEUBERT, W. J. (1991):** Isolation of paramyxo-like agent from teju (*Callisaurus maculatus*) and python (*Python regius*). Proceedings of the Second International Symposium on Viruses of Lower Vertebrates. July 29-31, 1991, Corvallis, Oregon; S. 203-210.

**AHNE, W., THOMSEN, I. und WINTON, J. (1987):** Isolation of a reovirus from the snake *Python regius*. Archives of Virology **94**: 135-139.

**ARIEL, E. (1997):** Pathology and serological aspects of Bohle iridovirus infections in six selected water-associated reptiles in North Queensland. PhD thesis, James Cook University, Queensland, Australia.

**BECK, W. und PANTCHEV, N. (2006):** Parasitosen bei Reptilien. In: BECK, W. (Hrsg), Praktische Parasitologie bei Heimtieren. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover, S. 242.

**BENETKA, V., GRABENSTEINER, E., GUMPENBERGER, M., NEUBAUER, C., HIRSCHMÜLLER, B. und MÖSTL, K. (2007):** First report of an iridovirus (Genus Ranavirus) infection in a Leopard tortoise (*Geochelone pardalis pardalis*). Wiener Tierärztliche Monatsschrift **94**: 243-248.

**BIERMANN, R. und BLAHAK, S. (1993):** First isolation of a herpesvirus from tortoise with diphtheroid-necrotizing stomatitis. 2<sup>nd</sup> World Congress Herpetology, Adelaide 29.12.- 06.01.1993, S. 27.

**BIERMANN, R. (1995):** Isolierung und Charakterisierung von Herpesviren bei Landschildkröten. Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Giessen.

**BLAHAK, S. (2000):** Virusinfektionen bei Reptilien. Der Praktische Tierarzt **81**: 92-112.

**BLAHAK, S., OTT, I. und VIELER, E. (1995):** Comparison of 6 different reoviruses of various reptiles. *Virusinfektionen bei Reptilien. Veterinary Research* **26:** 470-476

**BOYER, T. H. (1996):** Metabolic bone disease. In: MADER, D. R. (Hrsg.), *Reptile medicine and surgery*. Saunders Elsevier, St.Louis, Missouri, S. 385-392.

**BRAUNE, S., GEISS, V. und THIEL, W. (1989):** Eine neue durch Herpesviren verursachte Erkrankung bei Landschildkröten. *Tierärztliche Praxis* **17:** 416-419.

**CALVERT, I. (2004):** Nutritional disorders. In: Girling, S. J. und Raiti, P. (Hrsg.), *BSAVA Manual of Reptiles*, 2<sup>nd</sup> edition. British Small Animal Veterinary Association, Gloucester, UK, S. 289-308.

**Chappel, J.D., Duncan, R., Mertens, P.P.C. and Dermody, T. S. (2005):** Genus *Orthoreovirus* In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U. und Ball, L.A. (Hrsg.), *Elsevier Academic Press, London. Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, S. 455-465.

**CHINCHAR, V. G., ESSBAUER, S., HE, J. G., HYATT, A., MIYAZAKI, T., SELIGY, V. und WILLIAMS, T. (2005):** *Iridoviridae*. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. und Ball, L. A. (Hrsg.), *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, Academic Press, New York, S. 145-162.

**CLARK, H. F., LIEF, F. S., LUNGER, P. D., WATERS, D., LELOUP, P., FOELSCH, D. W. und WYLER, R. W. (1979):** Fer de Lance virus (FDLV): a probable paramyxovirus isolate from a reptile. *Journal of General Virology* **44:** 405-418.

**CLARK, N. B. (1969):** Parathyreoid glands and calcium and phosphate regulation in the Lizard, *Anolis carolinensis*. *General and Comparative Endocrinology* **12:** 614-618.

**CLARK, N. B. (1971):** The ultimobranchialbody of reptiles. Journal of experimental Zoology **178**: 115-124.

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

**COOPER, J. E.; GSCHMEISSNER, S. und HOLT, P. E. (1982):** Viral particles in a papilloma from a green lizard (*Lacerta viridis*). Laboratory Animals: **16**: 12-13.

**DÄMMRICH, K. (1967):** Pathomorphologische Befunde am Panzer der Schildkröten. Verhandlungsbericht des 9. Internationalen Symposiums der Erkrankung der Zoo.- und Wildtiere, Prag, Tschechische Republik, S. 271-274.

**DAVIS, P. M. C. (1981):** Anatomy and Physiology. In: Jackson O. F. und Cooper, J. E. (Hrsg.), Diseases of Reptilia Vol. 1: Academic Press, London, New York, Toronto, Sydney, San Francisco. S. 9-73.

**DAVISON, A. J., EBERLE, R., HAYWARD, G. S., MCGEOCH, D. J., MINSON, A. C., PELLETT, P. E., ROIZMAN, B., STUDDERT, M. J. und THIRY, E. (2009):** The order Herpesvirales. Archives of Virology **154**: 171-177.

**DENNERT, C. (1999):** Beitrag zur Ernährung europäischer Landschildkröten. Reptilia Nr.17 und Nr.18.

**DE VOE, R., GEISSLER, K., ELMORE, S., ROTSTEIN, D., LEW-BART, G. und GUY, J. (2004):** Ranavirus associated morbidity and mortality in a group of captive eastern box turtles (*Terrapene carolina carolina*). Journal of Zoo and Wildlife Medicine **35**: 534-543.

**DRURY, S. E., GOUGH, R. E., MCARTHUR, S. und JESSOP, M. (1998):** Detection of herpesvirus-like and papillomavirus associated with diseases of tortoises. The Veterinary Record **143**: 1227-1229.

- ESSBAUER, S. und AHNE, W. (2001):** Viruses of lower vertebrates. *Journal of Veterinary Medicine B* **48**: 403-475.
- FOELSCH, D. W. und LELOUP, P. (1976):** Fatale endemische Infektion in einem Serpentarium. *Tierärztliche Praxis* **4**: 527-536.
- FOWLER, M. E. (1986):** Metabolic bone disease. In: Fowler, M. E. (Hrsg.), *Zoo and wild animal medicine*, second edition, S. 69-90.
- FROST, J. W. und SCHMIDT, A. (1997):** Serological evidence for susceptibility of various tortoise species to herpesvirus infection. *Verhandlungsbericht des 38. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*, Zürich, Schweiz, S. 25-28.
- FRYE, F. L. (1973):** Husbandry, medicine and surgery in captive reptiles. In: Frye, F. L. (Hrsg.), *VM Publishing, Inc.*, 144 North Mettleton, Bonner Springs, Kansas.
- FRYE, F. L. (1991):** Biomedical and surgical aspects of captive reptile husbandry In: Frye, F. L. (Hrsg.), 2<sup>nd</sup> edition, Malabar Florida, Krieger Publishing Company, S. 46-49; 54-59; 536-537.
- GÖBEL, T. H. und SCHILDGER, B. (1990):** Bakterielle Infektionen bei Reptilien. *Verhandlungsbericht des 32. Internationalen Symposiums über Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere*, Eskilstuna, Schweden S. 205-210.
- GÖBEL, T. H. und SPÖRLE, H. (1992):** Blutentnahmetechnik und Serumnormalwerte wichtiger Parameter bei griechischen Landschildkröten (*Testudo hermanni hermannii*). *Tierärztliche Praxis* **20(2)**: 231-234.
- GRAVENDYK, M., AMMERMAN, P., MARSCHANG, R. E. und KALETA, E. F. (1998):** Paramyxoviral and reoviral infections of iguanas on Honduran Islands. *Journal of Wildlife Diseases* **34**: 33-38.

**GÜNTHER, K. (1969):** Die D-Vitamine. In: Lenkeit, W., Breierem, K. und Grasemann, E. (Hrsg.), Handbuch der Tierernährung, Paul Parey Hamburg und Berlin Bd.1, S. 126-132.

**HARPER, P. A. W., HAMMOND, D. C. und HEUSCHELE, W. P. (1982):** A herpesvirus-like agent associated with pharyngeal abscesses in a desert tortoise. *Journal of Wildlife Diseases* **18**: 491-494.

**HÄFELI, W. und SCHILDGER, B. (1995):** Reptilien. In: Göltenboth, R. und Klös, H.-G. (Hrsg.), Krankheiten der Zoo- und Wildtiere. Blackwell Wissenschaftsverlag, Berlin, S. 530-554.

**HÄFELI, W. und ZWART, P. (2000):** Panzerweiche bei jungen Landschildkröten und deren mögliche Ursache. *Praktischer Tierarzt* **81**: 129-132.

**HAUSER, B., METTLER, F. und HONEGGER, R. E. (1977):** Knochenstoffwechselstörung bei Seychellen-Riesenschildkröten. Verhandlungsbericht des 19. Internationalen Symposiums über Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Poznan, Polen, S. 241-245.

**HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1982):** Spontaneous viral hepatitis in a spur-tailed Mediterranean land tortoise (*Testudo hermanni*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **13**: 113-120.

**HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1984):** Virus associated gastrointestinal diseases in snakes. *Journal of Zoo Animal Medicine* **15**: 118-128.

**HELDSTAB, A. und BESTETTI, G. (1989):** Herpesviridae causing glossitis and meningoencephalitis in land tortoise (*Testudo hermanni*). *Herpetopathologia* **1**: 5-9.

- HETRICK, F. M. und HEDRICK, R. P. (1993):** New viruses described in finfish from 1988-1992. Annual Review of Fish Diseases **3**: 187-207.
- HIRSCH, M. L., KAPLAN, J. C. und D'AQUILA, R. T. (1996):** Antiviral agents. In: Fields, B. N., Knipe, D. M. und Howley, P. M. (Hrsg.), Fields virology. Lippincott-Raven, Philadelphia, New York, S. 431-466.
- HOLT, P. E. und COOPER, J. E. (1976):** Stomatitis in the greek tortoise (*Testudo graeca*). The Veterinary Record **98**: 156.
- HORZINEK, M. (1975):** Das Virus als infektiöse Einheit In: Kompendium der allgemeinen Virologie. Paul Parey Verlag Berlin und Hamburg, S. 85-114
- JACOBSEN, E. R., GASKIN, J. M., ROELKE, M., GREINER, E. C. und ALLEN, J. (1985):** Herpesvirus-like infection in Argentine tortoise. Journal of the American Veterinary Medical Association **187**: 1227-1229.
- JACOBSEN, E. R. (1994):** Causes of mortality and diseases in tortoises. A review. Journal of Zoo and Wildlife Medicine **25**: 2-17.
- JOHNSON, A. J., JACOBSEN, E. R., ORIGGI, F. C. und BROWN, R. (2003):** Herpesvirus infection in a captive desert tortoise (*Gopherus agassizii*). Proceedings of the 10<sup>th</sup> Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians Conference, Minneapolis, USA, S. 37-38.
- JOHNSON, A. J., PESSIER, A. P., WELLEHAN, J. F. X; BROWN, R. und JACOBSEN E. R. (2005):** Identification of a novel herpesvirus from a california desert tortoise (*Gopherus agassizii*). Veterinary microbiology **111**: 107-116.

**JOHNSON, A. J, PESSIER, A. P., WELLEHAN, J. F. X., CHILDRESS, A.; NORTON, T. M., STEDEMANN, N. L., BLOOM, D. C., BELZER, W., TITUS, V. R., WAGNER, R., BROOKS, J. W, SPRATT, J., und JACOBSEN, E. R. (2008):** Ranavirus infection of free-ranging and captive box turtles and tortoise in the United States, *Journal of Zoo and Wildlife Diseases* **44 (4)**: 851-863.

**JUST, F. T. und ESSBAUER, S. S. (2001):** Charakterisation of an iridescent virus isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthopters: *Gryllidae*). *Journal of Invertebrate Pathology* **73**: 51-61.

**KABISCH, D. und FROST, J. W. (1994):** Isolation of herpesvirus from *Testudo hermani* und *Agronemys horsfieldii*. Verhandlungsbericht des 36. Internationalen Symposiums über Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Kristiansand, Norwegen, S. 241-245.

**KOLESNIKOVAS, C. K. M., GREGO, K. F, RAMEH, DE ALBUQUERQUE, L. C., JACOBSEN, E. R., MONZENI, T. A., MEHNERT, D. U. und CATAO-DIAS, J. L. (2006):** Ophidian paramyxovirus in Brazilian vipers (*Bothrops alternates*). *The Veterinary Record* **159**: 390-392.

**KURATH, G., BATTS, W. N., AHNE, W. und WINTON, J. R. (2004):** Complete genome sequence of Fer-de-Lance virus reveals a novel gene in reptilian paramyxoviruses. *Journal of Virology* **78**: 2045-2056.

**LAMB, R. A., COLLINS, P. L., KOLAKOFSKY, D., MELERO, J. A., OLDSTONE, M. B. A., PRINGLE, C. R. und RIMA, B. K. (2005):** *Paramyxoviridae* In: Faquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. (Hrsg.), *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier Academic Press, Amsterdam, S. 655-668.

- LANGE, H., HERBST, W., WIECHERT, J. M. und SCHLIESSER, T. H. (1989):** Elektronenmikroskopischer Nachweis von Herpesviren bei einem Massensterben von griechischen Landschildkröten (*T. hermanni*) und Vierzehenschildkröten (*Agronemys horsfieldii*). Tierärztliche Praxis **17**: 319-321.
- Lukert, P. D. (1989):** Virus identification and classification. In: Purchase, H. G., Arp, L. H., Momeruth, C. H., Pearson, J. E. (Hrsg.), A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. Kendall/Hunt, Dubuque, S. 182-185.
- MADER, D. R. (2006):** Metabolic bone disease. In: Mader, D. R. (Hrsg.), Reptile Medicine and Surgery. Saunders, Elsevier, St. Louis, Missouri, S. 841-851.
- MAO, J., HEDRICK, R. P. und CHINCHAR, V. G. (1997):** Molecular characterisation, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridovirus, Virology **229**: 212-220.
- MARSCHANG, R. E. GRAVENDYCK, M. and KALETA, E. F. (1997):** Herpesvirus in tortoise: investigations into virus isolation and the treatment of viral stomatitis in *Testudo hermanni* and *T. graeca*. Journal of Veterinary Medicine B **44**: 385-394.
- MARSCHANG, R. E., POSTHAUS, H., GRAVENDYCK, M., KALETA, E. F. und BACCIARINI, L. N. (1998):** Isolation of viruses from land tortoise in Switzerland. Proceedings Joint Conference of the American Association of Zoo Veterinarians (AAZV) and the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Omaha, Nebraska, USA, S. 281-284.
- MARSCHANG, R. E., POSTHAUS, H., WILD, P., STERCI, P., KALETA, E. F. und BACCIARINI, L. N. (1998):** Isolation of an irido-like virus from Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*). EAZWV, 2<sup>nd</sup> Scientific meeting, May 21-24, Chester, UK, S. 287-294.

**MARSCHANG, R. E., BECHER, P., POSTHAUS, H., WILD, P., THIEL, H.-J., MÜLLER-DOBLIES, U., KALETA, E. F. und BACCIARINI, L. N. (1999):** Isolation and Characterisation of an iridovirus from Hermann's tortoise (*Testudo hermanni*). Archives of Virology **144**: 1909-1922.

**MARSCHANG, R. E. (2000):** Isolierung und Charakterisierung von Irido-, Herpes- und Reoviren aus Landschildkröten sowie die Beschreibung eines nicht charakterisierten zytopathogenen Agens. Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**MARSCHANG, E. E., DONAHOE, S., MANVELL, R. und LEMOS-ESPINAL, J. (2002):** Paramyxovirus and reovirus in wild caught Mexican lizards (*Xenosaurus* und *Abronia* ssp.). Journal of Zoo and Wildlife Medicine **33**: 317-321.

**MARSCHANG, R. E. und RÜMENAPF, T. (2002):** Virus „X“-Characterizing a new viral pathogen in tortoise. Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV), Reno, Nevada, USA, S. 101-102.

**MARSCHANG, R. E. und SCHNEIDER, R. M. (2002):** Antibodies to viruses in wild-caught spur-thighed tortoise (*Testudo graeca*) in Turkey. The Veterinary Record **161**: 102-103.

**MATHES, K. A. (2003):** Untersuchungen zum Vorkommen von Mykoplasmen und Herpesviren bei freilebenden und in Gefangenschaft gehaltenen Mediterranen Landschildkröten (*Testudo hermanni*, *Testudo graeca graeca* und *Testudo graeca iberica*) in Frankreich und Marokko. Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

**MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1974):**

Verhalten gegenüber Lipidlösemitteln. In: Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (Hrsg.), Virologische Arbeitsmethoden Bd. I. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. S.258.

**MAYR, A., BACHMANN, P. A., BIBRACK, B. und WITTMANN, G. (1974):**

Säurebehandlung. In: Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (Hrsg.), Virologische Arbeitsmethoden Bd. I. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. S.259- 260.

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

Quantitative Bestimmung der Virusinfektiosität (Virustitration). In: Mayr, A., Bachmann, P. A., Bibrack, B. und Wittmann, G. (Hrsg.), Virologische Arbeitsmethoden. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart. Band 2, S. 35-39.

**MCARTHUR, S., BLAHAK, S., KOELLE, P., JACOBSEN, E. R., MARSCHANG, R. E. und ORRIGI, F. (2002):** Chelonian Herpesvirus. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* **12**: 14-31.

**MÜLLER, M., ZANGGER, N. und DENZLER, T. (1988):** Iridovirus-Epidemie bei der griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni hermanni*). Verhandlungsbericht des 30. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Sofia, Bulgarien. S. 271-274.

**MÜLLER, M., SACHSSE, W. und ZANGGER, N. (1990):** Herpesvirus-Epidemie bei einer Griechischen (*Testudo hermanni*) und einer Maurischen Landschildkröte (*Testudo graeca*) in der Schweiz. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* **132**: 199-203.

**MULISCH, M. und WELSCH, U. (2010):** Färbemethoden In: Mulisch, M. und Welsch, U. (Hrsg.), *Romeis Mikroskopische Technik*. S. 203-204; 214-215; 227-228.

**MURAKAMI, M., MATSUBA, C., UNE, Y., NOMURA, Y., FUJITANI, H. (2001):**

Development of species-specific PCR techniques for the detection of tortoise herpesvirus. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **13**: 513-516.

**MURO, J., RAMIS, A., PASTOR, J., VELARDE, L., TARRES, J. und LAVIN, S.**

**(1998):** Chronic rhinitis associated with herpesviral infection in captive spurt-tighed tortoise from Spain. *Journal of Wildlife Diseases* **34**: 487-495.

**NÖLLER, W. und OTTEN, L. (1921):** Die Kochsalzmethode bei der Untersuchung von Haustierkokkizidien. *Berliner Tierärztliche Wochenschrift* **37**: 481-483.

**OETTLER, E. E.; STETLYER, Y. G. M. und WILLIAM, M. C. (1990):** High mortality in a tortoise colony. *South African Journal of wildlife Research* **20**: 21-25.

**O`MALLEY, B. (2005):** Tortoise. In: O`Malley, B (Hrsg.), *Clinical anatomy and physiology of Exotic species*, Elsevier Saunders S. 41-56.

**ORIGGI, F. C., ROMERO, C. H., KLEIN, P. A., BERRY, K. H., JOHNSON, A. und JACOBSEN, E. R. (2002):** Preliminary serological and molecular evidence of tortoise herpesvirus exposure and infection in Desert tortoise (*Gopherus agassizi*) from Mojave and Colorado deserts of California. *Proceedings Annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV)* S. 27-28.

**ORIGGI, F. C., ROMERO, C. H., BLOOM, D. C., KLEIN, P. A., GASKIN, J. M., TUCKER, S. J. und JACOBSON, E. R. (2004):** Experimental transmission of a herpesvirus in Greek tortoise (*Testudo graeca*). *Veterinary Pathology* **41**: 50-61.

**PETTAN-BREWER, K. C. B., DREW, M. L., RAMSAY, E., MOHR, F. C. und LOWENSTINE, L. J. (1996):** Herpesvirus particles associated with oral and respiratory lesions in a California Desert Tortoise (*Gopherus agassizii*). *Journal of Wildlife Diseases* **32**: 521-526.

**POUGH, F. H., ANDREWS, R. M., CADLE, J. E., CRUMP, M. L., SAVITZKY, A. H. und WELLS, K. D. (1998):** *Herpetology* Englewood Cliffs, N.J., Prentice Hall. Classification and diversity extant of reptiles, S. 75-133.

**RATHKE, H. (1848):** Erstes Kapitel: Von dem Skelete. In: Rathke, H. (Hrsg.), Ueber die Entwicklung der Schildkröten. Friedrich Vieweg und Sohn, Braunschweig, S. 107-108.

**ROLLE, M. und MAYR, A. (2007):** Allgemeine und spezielle Bakteriologie, Mykologie In: Rolle, M. und Mayr, A. (Hrsg.), Medizinische Mikrobiologie, Infektions und Seuchenlehre. S. 344-606.

**SASSENBERG, L. und ZWART, P. (2005):** Schildkröten In: Fehr, M., Sassenburg, L. und Zwart, P. (Hrsg.), Krankheiten der Heimtiere. Schlütersche Verlagsgesellschaft Hannover, S.653-737.

**SCHNELLER, P. und PANTCHEV, N. (2008):** In: Schneller, P und Pantchev, N. (Hrsg.), Parasitologie bei Echsen, Schlangen und Schildkröten. Edition Chimaira, Frankfurt/Main, S. 170-171.

**STANWAY, G., BROWN, F., CHRISTIAN, P., HOVI, T., HYYPIÄ, T., KING, A. M. Q., KNOWLES, N. J., LEMON, S. M., MINOR, P. D., PALLANSCH, M. A., PALMENBERG, A. C. und SKERN, T. (2005):** Family *Picornaviridae*. In: Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. (Hrsg.) "Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses". Elsevier/Academic Press, London. S. 757-778.

**STEINER, M. A. (2010):** Epidemiologische Studien zur Kinetik von Herpesvirus-antikörpern und Ausscheidung von Herpesviren in Beständen europäischer Landschildkröten, Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.

- TEIFKE, J. P., LÖHR, C. V., MARSCHANG, R. E., OSTERRIEDER, N. und POSTHAUS, H. (2000):** Detection of chelonid herpesvirus DNA by nonradiative in situ hybridization in tissues from tortoise suffering from stomatitis-rhinitis complex in Europe and North America. *Veterinary Pathology* **37**: 377-385.
- TORNEDE, C. (2006):** Untersuchungen zur Differenzierung von Herpesviren bei Landschildkröten durch Restriktionsendonukleasen, Serumneutralisationstest und PCR. Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- UHLENBROK, C. (2010):** Nachweise von Ranavirusinfektionen bei Landschildkröten und Charakterisierung von Virusisolaten, Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- UNE, Y., UEMURA, K., NAKANO, Y., KAMIL, J., ISHIABASHI, T. und NOMURA, Y. (1999):** Herpesvirusinfection in tortoise (*Malacochersus tornieri* und *Testudo horsfieldii*). *Veterinary Pathology* **36**: 624-627.
- VAN DEVANTER, D. R., WARRENER, P., BENNET, L., SCHULTZ, E. R., COULTER, S., GERBER, R. L. und ROSE, T. M. (1996):** Detection and analysis of diverse herpesviral species by consensus primer PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **34**:1666-1671.
- VILLEGAS, P. und LUKERT, P. D. (1998):** Virus identification and classification. In: Swayne, D. E., Gliesson, J. R., Jackwood, M. W., Pearson, J. E. und Reed, W. M. (Hrsg.). *A laboratory Manual for the isolation and Identification of Avian Pathogens*. American Association of Avian Pathologists, Kennet Square, PA. S. 241-247.
- VIX, M. und JAROFKE, D. (1997):** Viruskrankheiten der Reptilien. Verhandlungsbericht des 38. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere. Zürich, Schweiz. S. 17-24.

**WEINMANN, N. (2007):** Übertragung eines Iridovirus aus einem Helmchamäleon (*Chamaeleo hoehnelli*) auf Grillen der Spezies *Gryllus bimaculatus* und Versuch zur Infektion von Bartagamen (*Pogona vitticeps*) mit Iridovirus-infizierten Grillen. Veterinärmedizinische Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen.

**WENKER, C. J., POSTHAUS, H. und HÄFELI, W. (1997):** Parese der Hintergliedmaßen bei Schildkröten und Echsen -Ausgewählte Fälle und Versuch einer diagnostischen Annäherung. Verhandlungsbericht des 38. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Zürich, Schweiz. S. 51-56.

**WEST, G., GARNER, M., RAYMOND, J., LATIMER, K. S. und NORDHAUSEN, R. (2001):** Meningoencephalitis in a Boelen's python (*Morelia boeloni*) associated with paramyxovirus infection. Journal of Zoo and Wildlife Medicine **32**: 360-365.

**WESTHOUSE, R. A., JACOBSEN, E. R., HARRIS, R. K., WINTER, K. R. und HOMER, B. L. (1996):** Respiratory and pharyngo-eosophageal iridovirus infection in a gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*). Journal of Wildlife Diseases **32**: 682-686.

**WILLIAMS, T. (1996):** The Iridovirus. Advances in Virus Research **46**: 345-412.

**ZANGERL, R. (1969):** The turtle shell. In: Gans, C. (Hrsg.) Biology of reptilia. Academic Press, London and New York Vol. 1, S. 311-339.

**ZANGGER, N., MÜLLER, M. und PAGAN, O. (1991):** Virale Dermatitis bei einer Maurischen (*Testudo graeca*) und einer griechischen (*Testudo hermanni*) Landschildkröte in der Schweiz. Proceedings of the 4th International Colloquium of the pathology of Reptiles and Amphibians, Bad Nauheim, 27 - 29.09.1991, S. 25-29.

**ZWART, P. und TRUYENS, E. H. A. (1975):** Hexamitiasis in tortoisees. Veterinary Parasitology **1**: 175-183.

**ZWART, P., VAN DIJK, J. E. und JANSEN, E. F. (1992):** Pathomorphology of calcium metabolism in reptiles. Verhandlungsbericht des 34. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere, Santander, Spanien , S. 267-271.

## 9 Anhang

Tabelle 11: Untersuchte Spezies und Art der Tupferproben

Tagebuch-Nr	Spezies	Geschlecht	Tupferproben aus
S-06	T. g. i.	w	Ra, Kl
A-06	T. g. i.	w	Ra, Kl
R-06	T. g. i.	w	Ra, Kl
L-06	T. g. i.	m	Ra, Kl
P-06	T. g. i.	m	Ra, Kl
Z-06	T. m.	m	Ra, Kl
Sp-06	T. m.	m	Ra, Kl
Od-06	T. m.	m	Ra, Kl
Joh-06	T. h. b.	m	Ra, Kl
Iv-06	T. h. b.	w	Ra, Kl
M-06	G. e.	m	Ra, Kl
QU-06	T. h. b.	m	Ra, Kl
05/006	T. g. i.	m	A, Ra, Kl,
00/006	T. g. i.	w	A, Ra, Kl
85/07/01	T. g. t.	w	A, Ra, Kl
85/07/02	T. g. t.	w	A, Ra, Kl
85/07/03	T. g. t.	m	Ra ,Kl
86/07/01	T. g. i.	m	A,Ra,Kl
86/07/02	T. g. i.	m	A,Ra, Kl
86/07/03	T. g. i.	w	A, Ra, Kl
86/07/04	T. g. i.	w	A, Ra, Kl
884/1	T. h. b.	w	Ra, Kl
884/2	T. h. b.	w	Ra, Kl
884/3	T. h. b.	m	Ra, Kl
884/4	T. h. b.	w	Ra, Kl
884/5	T. h. b.	m	Ra ,Kl
884/6	T. h. b.	m	Ra, Kl
884/7	T. h. b.	w	Ra, Kl
884/8	T. h. b.	w	Ra, Kl
884/9	T. h. b.	m	Ra, Kl
885/1	T. m.	w	A, Ra, Kl
885/2	T. m.	w	Ra, Kl
885/3	T. m.	w	A, Ra, Kl

Tgb-Nr	Spezies	Geschlecht	Tupferproben aus
885/4	T. m.	w	Ra, Kl
885/5	T. m.	m	Ra, Kl
886/1	A. h.	w	Ra, Kl
886/2	A. h.	w	Ra, Kl
886/3	A. h.	m	Ra, Kl
887/1	T. g. t.	w	Ra, Kl
887/2	T. g. t.	w	Ra, Kl
887/3	T. g. t.	w	Ra, Kl
878/1	A. g.	m	A
878/2	A. g.	m	A
879/1	G. p.	w	A, Ra, Kl
879/2	G. p.	w	A, Ra, Kl
881/1	G. c.	w	A
881/2	G. c.	w	A
881/3	G. c.	m	A
882	G. r.	w	A

Tagebuchnummern der untersuchten Tiere.

Spezies: T. g. = *Testudo graeca iberica*; T. g. g. = *Testudo graeca terrestris*; T. m. = *Testudo marginata*; T. h. b. = *Testudo hermanni boettgeri*; A. h. = *Astrochelys horsfieldii*; G. e. = *Geochelone elegans*;

G. c. = *Geochelone carbonaria*; G. p. = *Geochelone pardalis*; G. r. = *Geochelone radiata*; A.g. = *Aldabrachelis gigantea*

Geschlecht: M = männlich, W = weiblich

Untersuchte Proben: A = Auge, Ra = Rachen, Kl = Kloake

**Tabelle 12: Virusisolierung aus den Tupferproben in TH-1**

Tgb.-Nr	Spezies	Geschlecht	Untersuchte Tupfer	ZPE in Zellkultur
S-06	T. g. i.	w	Ra Kl	pos
A-06	T. g. i.	w	Ra Kl	pos
R-06	T. g. i.	w	Ra Kl	pos
L-06	T. g. i.	m	Ra Kl	pos
P-06	T. g. i.	m	Ra Kl	pos
Z-06	T. m.	m	Ra Kl	pos
Sp-06	T. m.	m	Ra Kl	pos
Od-06	T. m.	m	Ra Kl	pos
Joh-06	T. h. b.	m	Ra Kl	pos
Iv-06	T. h. b.	w	Ra Kl	pos
M-06	G. e.	m	Ra Kl	pos
QU-06	T. h. b.	m	Ra Kl	pos
05/006	T. g. i.	m	A Ra Kl,	pos
00/006	T. g. i.	w	A Ra Kl	pos
85/07/01	T. g. t.	w	A Ra Kl	pos
85/07/02	T. g. t.	w	A Ra Kl	pos
85/07/03	T. g. t.	m	Ra Kl	pos
86/07/01	T. g. i.	m	A Ra Kl	pos
86/07/02	T. g. i.	w	A Ra Kl	pos
86/07/03	T. g. i.	w	A Ra Kl	pos
86/07/04	T. g. i.	w	A Ra Kl	pos
884/1	T. h. b.	w	Ra Kl	<b>neg</b>

Tgb-Nr	Spezies	Geschlecht	Untersuchte Tupfer	ZPE in Zellkultur
884/2	T. h. b.	w	Ra Kl	neg
884/3	T. h. b.	m	Ra Kl	pos
884/4	T. h. b.	w	Ra Kl	neg
884/5	T. h. b.	m	Ra Kl	pos
884/6	T. h. b.	m	Ra Kl	pos
884/7	T. h. b.	w	Ra Kl	neg
884/8	T. h. b.	w	Ra Kl	pos
884/9	T. h. b.	m	Ra Kl	pos
885/1	T. m.	w	A Ra Kl	pos
885/2	T. m.	w	Ra Kl	neg
885/3	T. m.	w	A Ra Kl	pos
885/4	T. m.	w	Ra Kl	pos
885/5	T. m.	m	Ra Kl	pos
886/1	A. h.	w	Ra Kl	neg
886/2	A. h.	w	Ra Kl	neg
886/3	A. h.	m	Ra Kl	neg
887/1	T. g. t.	w	Ra Kl	pos
887/2	T. g. t.	w	Ra Kl	pos
887/3	T. g. t.	w	Ra Kl	pos
878/1	A. g.	m	A	neg
878/2	A. g.	m	A	neg
879/1	G. p.	w	A Ra Kl	neg
879/2	G.p	w	A Ra Kl	pos
881/1	G. c.	w	A	neg
881/2	G. c.	w	A	neg
881/3	G. c.	m	A	neg
882	G. r.	w	A	neg

Spezies: T. g. = *Testudo graeca iberica*; T. g. g = *Testudo graeca terrestris*; T. m. = *Testudo marginata*; T. h. b. = *Testudo hermanni boettgeri*; A. h. = *Astrochelys horsfieldi*; G. e.= *Geochelone elegans*; G. c. = *Geochelone carbonaria*; G. p. = *Geochelone pardalis*; G. r = *Geochelone radiata*; A. g. = *Aldabrachelis gigantea*  
 Geschlecht: M= männlich, W= weiblich  
 Untersuchte Proben: A=Auge, Ra= Rachen, Kl= Kloake

**Tabelle 13: Infektiositätstiter der untersuchten Tupferproben in TH-1-Zellkultur**

Tgb.-Nr	Spezies	Untersuchte Proben	Infektiositätstiter in KID <sub>50</sub> je ml
S-06	T. g. i.	Ra	4,0
		Kl	3,1
A-06	T. g. i.	Ra	3,3
		Kl	3,2
R-06	T. g. i.	Ra	4,5
		Kl	4,6
L-06	T. g. i.	Ra	6,1
		Kl	5,5
P-06	T. g. i.	Ra	6,5
		Kl	5,5
Z-06	T. m.	Ra	3,6
		Kl	3,5
Sp-06	T. m.	Ra	4,5
		Kl	5,4
Od-06	T. m.	Ra	3,2
		Kl	2,5
Iv-06	T. h. b.	Ra	5,5
		Kl	6,0
M-06	G. e.	Ra	6,0
		Kl	4,8
QU-06	T. h. b.	Ra	3,5
		Kl	2,5
05/006	T. g. i.	A	5,5
		Ra	5,5
		Kl,	5,5
00/006	T. g. i.	A	4,5
		Ra	5,5
		Kl	4,5
85/07/01	T. g. t.	A	3,2
		Ra	4,5
		Kl	4,4

TgB-Nr	Spezies	Untersuchte Probe	Infektionstiter in KID <sub>soje</sub> ml <sup>-1</sup>
85/07/02	T. g. t.	A	6,0
		Ra	6,0
		Kl	5,5
85/07/03	T. g. t.	Ra	3,5
		Kl	3,5
86/07/01	T. g. i.	A	5,5
		Ra	6,1
		Kl	6,0
86/07/02	T. g. i.	A	3,1
		Ra	2,5
		Kl	3,2
86/07/03	T. g. i.	A	4,2
		Ra	4,5
		Kl	4,4
86/07/04	T. g. i.	A	5,0
		Ra	5,2
		Kl	5,0
884/3	T. h. b.	Ra	2,1
		Kl	2,2
884/5	T. h. b.	Ra	3,5
		Kl	3,3
884/6	T. h. b.	Ra	3,1
		Kl	3,3
884/8	T. h. b.	Ra	4,5
		Kl	4,2
884/9	T. h. b.	Ra	5,0
		Kl	3,0
885/1	T. m.	A	5,5
		Ra	5,6
		Kl	4,5
885/3	T. m.	A	3,2
		Ra	3,3
		Kl	3,1
885/4	T. m.	Ra	5,5
		Kl	5,4
885/5	T. m.	Ra	4,0
		Kl	3,5
887/1	T. g. t.	Ra	5,5
		Kl	5,3
887/2	T. g. t.	Ra	6,0
		Kl	5,5
887/3	T. g. t.	Ra	4,5
		Kl	4,0
879/2	G. p.	A	3,0
		Ra	2,5
		Kl	3,1



Anhang

---

TTTGCATTTTCTGTCTGTGTCAACCTTGCAAATGTCATCTTATTCACAATGAGATCTACA  
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 300

AAACGTAAGACAGACACAGTTGGAACGTTTACAGTAGAATAAGTGTACTCTAGATGT  
  
C I F C L C Q P C K C H L I H N E I Y  
T -

CGATTTGCTATTTTACAGATGAAGAAAAGAAAGAATACCAAATACAAGGTCAAGGACAGA  
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 360

GCTAAACGATAAAAATGCTACTTCTTTTCTTTCTTATGGTTTATGTTCCAGTTCCTGTCT  
  
I C Y F T D E E K K E Y Q I Q G Q G Q  
S -

GCAATGCTCGACCTAATCAGCAGAGTAATTATGGCACAATTACTAATAACTATTATGAAA  
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 420

CGTTACGAGCTGGATTAGTCGTCTCATTAAATACCGTGTTAATGATTATTGATAATACTTT  
  
N A R P N Q Q S N Y G T I T N N Y Y E  
N -

ACACTTACATAGCTTCTGCTGATATGTCTACCCAAGCCAATGGGAACGAAGGTGATATAC  
421 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 480

TGTGAATGTATCGAAGACGACTATACAGATGGGTTTCGGTTACCCTTGCTTCCACTATATG  
  
T Y I A S A D M S T Q A N G N E G D I  
P -

CTGAAGTTCCTGGAATTTGGTCAACACTAAATGGGGTAGTTGATACTGCAAGTGCCATGG  
481 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 540

GACTTCAAGACCTTAAACAGTTGTGATTTACCCCATCAACTATGACGTTACGGTACC  
  
E V P G I W S T L N G V V D T A S A M  
A -

CACCCCTCCTTCTGGATCAAGATACAGAAGAAACAACAAATCTCTCTGATCGTGTAAAA  
541 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 600

GTGGGGAGGAAGACCTAGTTCTATGTCTTCTTTGTTGTTTAGAGAGACTAGCACAATTTT  
  
P L L L D Q D T E E T T N L S D R V K  
T -

CGTCCATTCACGGAAACACATCAGTGGGAACCCAATCTAGTGTAGGGACTGTAATTGGCT  
601 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 660

GCAGGTAAGTGCCTTTGTGTAGTCACCCCTGGGTTAGATCACATCCCTGACATTAACCGA  
S I H G N T S V G T Q S S V G T V I G  
Y -

ATAAAAAAGAAAAAGACACAAACCCTATTTTCATCTTGTGCTGATGCTCCCACTGTTGCAT  
661 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 720

TATTTTTTCTTTTTCTGTGTTTGGGATAAAGTAGAACACGACTACGAGGGTGACAACGTA  
K K E K D T N P I S S C A D A P T V A  
S -

CTTTTGCAATGGAGAGAGCATTACACAAACAATGGGAACTGGTCAAAAACAAATGATG  
721 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 780

GAAAACGTTACCTCTCTCGTAAATGTGTTTGTACCCCTGAACCAGTTTTTGTTTACTAC  
F A M E R A F T Q T M G T W S K T N D  
V -

TATATCAATATATCCACATTTGTCTACCTTCTGGTATAGATGATGGTGGGGTCTTTTCTG  
781 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 840

ATATAGTTATATAGGTGTAACACAGATGGAAGACCATATCTACTACCACCCAGAAAAGAC  
Y Q Y I H I C L P S G I D D G G V F S  
G -

GAGTCTAAATAGACACTACCTAATGAAATGTGGCTACAAAGTTCAAGTTCAAATGAATG  
841 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 900

CTCAAGATTTATCTGTGATGGATTACTTTACACCGATGTTTCAAGTTCAAGTTTACTTAC  
V L N R H Y L M K C G Y K V Q V Q M N  
A -

CATCCCAAGTTCCCACTCTGGCAGTCTTGGAGTGTCTTCTAATCCCAAGTTCACTCCACAAA  
901 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 960

GTAGGGTCAAGGTGAGACCGTCAGAACCTCACAAAGATTAGGGTCTCAAGTGAGGTGTTT

Anhang

---

N - S Q F H S G S L G V F L I P E F T P Q

ACAGTTTGAAGCTAAGTCAACAACATTTAAACCTCTACCTAGAGAAAAATATGTTCCAG  
961 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1020

TGTCAAAACCTCGATTTCAGTTGTTGTAATTTGGAGATGGATCTCTTTTATACAAGGTC

E - S F E A K S T T F K P L P R E K Y V P

AACAACGTGTTGTTTACCTCACCAAATTTCTAAACTGCAGAACTAACACATTCAGTTGATA  
1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1080

TTGTTGACAAAACAAATGGGAGTGGTTTAAAGATTTGACGTCTTGATTGTGTAGTCAACTAT

I - Q L F V Y P H Q I L N C R T N T S V D

TCCAGGTTCCCTATTGTAATTTGTTCCAAGTTCTTCAATGAAATCCACAATACCTGGA  
1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1140

AGGTCCAAGGAATAACATTAACAAGGTTCAAGAAAGTTACTTTAGGTGTTATGGACCT

T - Q V P Y C N F V P S S F N E I H N T W

CACFGGTAGTGTGTTCTAACTCCTCTTGACTACTCAACAGGAGCTGCAACTGACATTG  
1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1200

GTGACCATCACTACCAAGATTGAGGAGAACTGATGAGTTGTCCTCGACGTTGACTGTAAC

A - L V V M V L T P L D Y S T G A A T D I

CCATTACAACATCAATAACTCCACTTGATGTTCTGTATAATGGTCTGAGACATCTTAAAG  
1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1260

GGTAATGTTGTAGTTATTGAGGTGAACTACAAGACATATTACCAGACTCTGTAGAATTC

E - I T T S I T P L D V L Y N G L R H L K

AAGAAGGCATTCACAACCTCCAGAAGGGTCTTCGTATACTTTTTCAACTACAAACATTG  
1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1320

TTCTCCGTAAGGTTGTGAGGTCTTCCAGAAGCATATGAAAAAGTTGATGTTTGTAAAC

Anhang

---

D - E G I P T L P E G S S Y T F S T T N I

ACATGGCTCAACCTGTTTATTCAAAGGTTTTAATCCAACCTCAAACCTACATTCCAGGCA  
1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 1380

TGTACCGAGTTGGACAAATAAGTTTTCCAAAATTAGGTTGAGTTTTGATGTAAGGTCGGT

K - M A Q P V Y S K G F N P T Q N Y I P G

AATTTACAAACCTTCTGCAAATGTCAGTAACTCCAACCCTTATGGCTAATCAAATTGGTT  
1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 1440

TTAAATGTTTGGGAAGACGTTTACAGTCATTGAGGTTGGGAATACCGATTAGTTTAACCAA

S - F T N L L Q M S V T P T L M A N Q I G

CTGAAGGTGAGAGTAAACAAGTTGGATACTTTATGTGTACAAACCAAGTACCAACTCTAC  
1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 1500

GACTTCCACTCTCATTGTTCAACCTATGAAATACACATGTTTGGTTCATGGTTGAGATG

P - E G E S K Q V G Y F M C T N Q V P T L

CACTGTTTGTTCAGATGTTACTCTTGCTGCCCCAAAAATGAAAACCACACTGGTTTCTG  
1501 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 1560

GTGACAAACAAAGTCTACAATGAGAACGACGGGGTTTTTACTTTTGGTGTGACCAAAGAC

A - L F V S D V T L A A P K M K T T L V S

CCATAAGTCAGTACTTTACACAGTACCGAGGTTCAATTGTTATGGATCTCGTGTTCAGT  
1561 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 1620

GGTATTCAGTCATGAAATGTGTCATGGCTCCAAGTTAACAATACCTAGAGCACAAAGTGAC

G - I S Q Y F T Q Y R G S I V M D L V F T

GAACCGCCATGTGCAAAGGAAAGTTTGTAAATTTGCTACACACCTCCAGGTGCTGCACAAC  
1621 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 1680

# Anhang

---

CTTGGCGGTACACGTTTCCTTTCAAACATTAACGATGTGTGGAGGTCCACGACGTGTTG  
P - T A M C K G K F V I C Y T P P G A A Q

CACAAACAAGAGAGAAGGCAATGCAAGGGACCTATGCTGTTTGGGATCTTGGACTCAACT  
1681 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1740

GTGTTTGTCTCTCTCCGTTACGTTCCCTGGATACGACAAACCCTAGAACCTGAGTTGA  
S - Q T R E K A M Q G T Y A V W D L G L N

CATCTTTTAAATTCACAATTCCTTTTCATTTCTGTTTCAGACTACAGATGGGTTGATGGTG  
1741 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1800

GTAGAAAATTTAAGTGTTAAGGAAAGTAAAGACAAAGTCTGATGTCTACCCAACCTACCAC  
A - S F K F T I P F I S V S D Y R W V D G

CTCCGCTACTTCAATATCAATTGATGGATGGTTCACTATTTGGCAACTTACACCAATTA  
1801 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1860

GAGGCAGATGAAGTTATAGTTAACTACCTACCAAGTGATAAACCGTTGAATGTGGTTAAT  
T - P S T S I S I D G W F T I W Q L T P I

CCTATCCAGCAAACAATCCAAACATTTTCATGTGTTCTTGTATTTCGCATCTGCAGGAAGT  
1861 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1920

GGATAGGTCGTTTGTAGGTTTGTAAGTACACAAGAACATAAGCGTAGACGTCCTTGAC  
D - Y P A N N P N I S C V L V F A S A G T

ACTTTTCATACAGAAATCTGACTGATATTCCAATGCGCAGCCAAGGCACTGAAGTAGGAG  
1921 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 1980

TGAAAAGTATGTCTTTAGACTGACTATAAGGTTACGCGTCGGTTCCTGACTTCATCCTC  
E - F S Y R N L T D I P M R S Q G T E V G

AAAGTGGTGATACTGGAAATTCAAATGCTACAGAAAATATAATCGGAACATCCATTTCAA

Anhang

---

1981 -----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2040

TTTCACCACTATGACCTTTAAGTTTACGATGTCTTTTATATTAGCCTTGTAGGTAAAGTT

T - S G D T G N S N A T E N I I G T S I S

CAGAAGTATCACATTCAGAGATTGACTTCATATTTTCTAGGTATTTCAACGTAGATACCA

2041 -----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2100

GTCTTCATAGTGTAAGTCTCTAACTGAAGTATAAAAAGATCCATAAAGTTGCATCTATGGT

T - E V S H S E I D F I F S R Y F N V D T

CTCGTGTAACAACCTACACCGGTAATGAAAACGTGACGTCAATTACACTGAGCATTATG

2101 -----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2160

GAGCACATTGTTGGATGTGGCCATTACTTTTGCACCTGCAGTTAATGTGACTCGTAAATAC

D - R V T T Y T G N E N V T S I T L S I Y

ATTTTCTTCAAAAACCAACAGCTCAAGCACTAAAAAGATTTCTGCAAAATTGTGACATATT

2161 -----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2220

TAAAAGAAGTTTTTGGTTGTCGAGTTCGTGATTTTTCTAAAGACGTTTAACTGTATAA

F - F L Q K P T A Q A L K R F L Q I V T Y

TTAAATCAGATCTGAAAATTGCAGTAACTCCCTTAACACAATTTCAACAAAAATGTTG

2221 -----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2280

AATTTAGTCTAGACCTTTAACGTCATTGAGGGGAATTGTGTTAAAGTTGTTTTTACAAC

V - K S D L E I A V T P L N T I S T K M F

TGAAATGGCTTCCTTCAGGTTGAGTTGTTGATCTAACCAGAGAAACACTCAACAGCATAA

2281 -----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2340

ACTTTACCGAAGGAGTCCAAGTCAACAACACTAGATTGGTCTCTTTGTGAGTTGTCGTATT

N - K W L P S G S V V D L T R E T L N S I

Anhang

---

ACACTCCAAGATTCATAAAGAACACATCAGGGGCACCACTGCAAATATTTAATACTGACA  
2341 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 2400

TGTGAGGTTCTAAGTATTTCTTGTGTAGTCCCGTGGTGACGTTTATAAATTATGACTGT  
  
T P R F I K N T S G A P L Q I F N T D  
I -

TCTACTAATGTGTGCACTTTCAGAGTTCATATACTTCTGTACTAGGAGCCATACCTATAA  
2401 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 2460

AGTGATTACACACGTGAAAGTCTCAAGGTATATGAAGACATGATCCFCGGTATGGATATT  
  
T N V C T F R V P Y T S V L G A I P I  
T -

CTTATAATGGTTATGGAGATTTTTCACAGACAGCATACAATGTTGCTCCTGGTGTGACT  
2461 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 2520

GAATATTACCAATACCTCTAAAAAGTGTCTGTTCGTATGTTACAACGAGGACCACGACTGA  
  
Y N G Y G D F S Q T A Y N V A P G A D  
F -

TTGGAACACTTCTTTTTCGAAACACTGGTCTCTGTTGGGATGCAAATAATGCTCTCTGTTA  
2521 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 2580

AACCTTGTGAAGAAAACGTTTGTGACCAAGACAACCTACGTTTATTACGAGAGACAAT  
  
G T L L F A N T G S V G M Q I M L S V  
R -

GATTGTGAAATATGCAGTGTGGATTCTTAGGACCCTTGCTCCTAAAAATTTCTGTAACAA  
2581 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 2640

CTAAACATTTATACGTCAACCTAAGGATCCTGGGAACGAGGATTTTAAAGACATTGTT  
  
F V N M Q C W I P R T L A P K I S V T  
N -

ATACTGATGCTAACATTCTGTCTACAAGGAGTGCCTAACTGAAGAAATTTGTGTTTCAGG  
2641 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- 2700

TATGACTACGATTGTAAGAACGATGTTCTCCTCACGTGATTGACTTCTTTAACACAAAAGTCC  
  
T D A N I L A T R S A L T E E I V F Q  
G -

GTCTAAGTGAATTTGTTCTTAGTCAACAGTGTTCATGCTAAACTTTTTCTTCTACAAG  
2701 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2760

CAGATTCACCTTAAACAAGGATCAGTTGTCACAAGTACAGATTTGAAAAAGGAAGATGTTCT  
L S E F V P S Q Q C S C L N F F L L  
Q E -

AACATATTGAAGAAGCAATGGAAGAAATCAGTGTCTCTGCAGTTGTAATCCATCTACAA  
2761 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2820

TTGTATAACTTCTTCGTTACCTTCTTTAGTCACAAGAGACGTCAACATTAGGTAGATGTT  
H I E E A M E E I S V L C S C N P S T  
K -

AAAATATCATCAACAAGAGAGCCTAGAAGCAATGTATCAAGTACTTAGTCACATGTCTCT  
2821 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2880

TTTTATAGTAGTTGTTTCTCTCGGATCTTCGTTACATAGTTCATGAATCAGTGTACAGGA  
N I I N K E S L E A M Y Q V L S H M S  
C -

GTAGTGTTCACTACACATGGGAGGATGTAGGATTTGATATACTTCTACAACACTAGCTACA  
2881 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 2940

CATCACAAGTGATGTGTACCCTCCTACATCCTAAACTATATGAAGGATGTTGATCGATGT  
S V H Y T W E D V G F D I L P T T S Y  
S -

GTGGCTGTACTGTGATAGAGATGATTTCAACGATGTTCTAGAGACAATTGGACACAACA  
2941 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3000

CACCGACAATGACACTATCTCTACTAAAGTTGCTACAAGATCTCTGTTAACCTGTGTTGT  
G C Y C D R D D F N D V L E T I G H N  
M -

TGTGGGACCTAAAGTCAAAGGAGTTGACACCCAAATCTTGAAGTTTACAGAATGTACA  
3001 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3060

ACACCCCTGGATTTTCAGTTTTCTCAACTGTGGGTTTAAAGAACTTCAAATGTCTTACATGT  
W D L K S K G V D T Q I L E V Y R M Y  
I -

TCAGTGATGTTGAATGTGAAAACCATTGGATCAGAGATCTAGCTGCTGATGGTATGTTG  
3061 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3120

AGTCACTACAACCTTACACTTTTGGTAAACCTAGTCTCTAGATCGACGACTACCACTACAAC  
S D V E C E N H W I R D L A A D G D V  
E -

AACAAAATCCTGGTCCTGCCTCCTACAATCTGTTCTTTTCCAATACAAGATATCTTGTC  
3121 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3180

TTGTTTTAGGACCAGGACGGAGGATGTTAGACAAGAAAAGGTTATGTTCTATAGAACAGT  
Q N P G P A S Y N L F F S N T R Y L  
V T -

CAATGAAAATGAGGAAATCAAGAAAAGAAATAGACAACAAGGTTTCATTGATTGGCTAA  
3181 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3240

GTTACTTTTACTCCTTTAGTTCTTTTCTTTAATCTGTTGTTCCAAAGTAACTAACCGATT  
M K M R K S R K E I R Q Q G F I D W L  
T -

CTGATGGAGCAGTTACTTTCAGTAAAAGATGCAGCACAAAATCTAACAAATGTGATTCAAA  
3241 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3300

GACTACCTCGTCAATGAAGTCATTTTCTACGTCGTGTTTGTAGATTGTTTACACTAAGTTT  
D G A V T S V K D A A Q N L T N V I Q  
S -

GTACTAATAAAATTATGAATAGAGCCTTTTCTTGTAGGACTATCATCAAGATTATAACTG  
3301 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3360

CATGATTATTTTAACTTATCTCGGAAAAGAACATCCTGATAGTAGTTCTAATATTGAC  
T N K I M N R A F S C R T I I K I I T  
D -

ATTTTTAACATCTGGACTAATATTGTATACATGTGATTTTAACTCACAATAGCTGCAG  
3361 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3420

TAAAAAATTGTAGACCTGATTATAACATATGTACACTAAAATTAGGATGTTATCGACGTC

Anhang

---

V - F L T S G L I L Y T C D F N P T I A A

TTTTGGCCATAAAACATGGTCTAGACATGCTTGTAGAAGGTAGTGTTTTTGTCTCATCA  
3421 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3480

AAAACCGGTATTTTTGTACCAGATCTGTACGAACATCTCCATCACAAAAACAGGAGTAGT

T - L A I K H G L D M L V E G S V F V L I

CAGAACAAC TGAAAAACTCTTTAAGACTGACCCACCTACAGTTGATGGAGGAGAAATTG  
3481 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3540

GTCTTGTGACTTTTTTGAGAAATCTGACTGGGTGGATGTCAACTACCTCCTCTTTAAC

E - E Q L K K L F K T D P P T V D G G E I

AGCAACAAGGAGTTTTGAGAGATTTTAACACAGTGGTTAATGCTGCTAAGGGAATTGAGT  
3541 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3600

TCGTTGTTCCCTAAAACCTCTCTAAAATTGTGTCACCAATTACGACGATTCCTTAACTCA

W - Q Q G V L R D F N T V V N A A K G I E

GGTTTCTAAAACTATACAAAACCTTTATGATTGGCTTAAATCATGGTGTCAAAAAGAGG  
3601 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3660

CCAAAGATTTTTGATATGTTTTGGAATACTAACCGAATTTAGTACCACAGTTTTTCTCC

E - F L K T I Q N L Y D W L K S W C Q K E

AAGAAAGCTGCCATGGAAGATATGCAAAAATGATGGACACTCTTGGTGTGAACTTCAAG  
3661 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3720

TTCTTTGACGGTACCTTCTATACGTTTTTACTACCTGTGAGAACCACAACCTTGAAGTTC

V - E S C H G R Y A K M M D T L G V E L Q

TTGCTGATAATTTGATCTCTAGAATTCATGAGTCAACAAAAGAAAACTCAGAACTACAA  
3721 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3780

AACGACTATTAAC TAGAGATCTTAAGTACTCAGTTGTTTTCTTTTAGAGTCTTGATGTT

Anhang

---

I - A D N L I S R I H E S T K E N L R T T

TTGGCAAATACTGAGTATTCAATCATTGCAATGGAAGTGGAAAAGACACAAGTTGCTT  
3781 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3840

AACCGTTTGATTGACTCATAAGTTAGTAACGTTACCTTCACCTTTTCTGTGTCAACGAA

S - G K L T E Y S I I A M E V E K T Q V A

CAATAATTGAAAAGAGGTTGACTCCAATTAGAAATTATTATGATCAGCTTTATGGCTCAG  
3841 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3900

GTTATTAACTTTTCTCCAAGTGAAGTTAATCTTTAATAATACTAGTCGAAATACCGAGTC

G - I I E K R L T P I R N Y Y D Q L Y G S

GAACAATTAGAGCAGAACCTCCAGTTGTACTGCTACGTGGAAAACCTGGATGTGGAAAGT  
3901 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 3960

CTTGTTAATCTCGTCTTGGAGGTCAACATGACGATGCACCTTTTGACCTACACCTTTCA

S - T I R A E P P V V L L R G K P G C G K

CTGTAGTTTCTATGTTGATGTCGCAAGCCATTTCAAAAATTGTAACAGGAAGTCAATCTG  
3961 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4020

GACATCAAAGATACAACCTACAGCGTTCGGTAAAGTTTTTAACATTGTCCCTFCAGTTAGAC

V - V V S M L M S Q A I S K I V T G S Q S

TATATACATTCCCTACTTCTTACTACATGGATGGATACAAACAGCAATATGTTATGG  
4021 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4080

ATATATGTAAGGGATGAAGAAGATGAGTGTACCTACCTATGTTTGTGCGTTATACAATACC

V - Y T F P T S S T H M D G Y K Q Q Y V M

TAATGGATGATCTTGGACAAAATCCAGATGGTGAAGATTTTAAAATTTTTGTCAACTTG  
4081 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4140

Anhang

---

ATTACCTACTAGAACCTGTTTTAGGTCTACCACTTCTAAAATTTTATAAAAACAGTTGAAC

                  M D D L G Q N P D G E D F K I F C Q L  
V -

TCTCAACTGCAAAAATTTGTAGTCCCAATGGCGTCTCTTATGAAAAAGGTACTGAATTTA

                  4141 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4200

AGAGTTGACGTTTTAAACATCAGGGTTACCGCAGAGAATACCTTTTTCCATGACTTAAAT

                  S T A K F V V P M A S L M E K G T E F  
N -

ATACTGGAGTAATAATTGCAACTACTAATTTGCCTGAATTTAAACCGTAACAATAGTTG

                  4201 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4260

TATGACCTCATTATTAACGTTGATGATTAACGGACTTAAATTTGGGCATTGTTATCAAC

                  T G V I I A T T N L P E F K P V T I V  
E -

AACCAGGTGCAGTTGATAGAAGAATAACATGGAAGTTTACCCCTGAAATTAGGAAAGAAT

                  4261 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4320

TTGGTCCACGTCACCTATCTTCTTATTGTACCTTCAAATGGGGACTTTAATCCCTTCTTA

                  P G A V D R R I T W K F T P E I R K E  
F -

TCTTGAAAGATGGGAAACTAAACCTGGAGTTGCTACTGAATGACTCTGGTAACACTCCAC

                  4321 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4380

AGAACTTTCTACCCCTTGATTTGGACCTCAACAGTGACTTACTGAGACCATTGTGAGGTG

                  L K D G K L N L E L S L N D S G N T P  
P -

CAAAAGGTTTTCACAGGGACTGTCCATTGATTAATGGTAAAGCCCTTACACTTAACACTC

                  4381 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4440

GTTTTCAAAGTGTTCCTGACAGGTAACATAATTACCATTTCCGGGAATGTGAATTGTGAG

                  K G F T R D C P L I N G K A L T L N T  
P -

CATCAGGAGCAAAAATATTCTGTGTGAGAAGCAGTTGACCTAATAATTGGGACACTAAAAAC

Anhang

---

4441 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4500

GTAGTCCTCGTTTTATAAGACACAGTCTTCGTCAACTGGATTATTAACCCTGTGATTTTG  
S G A K Y S V S E A V D L I I G T L K  
H -

ACAAAAGTAATGTTGCAATGGATCTATCTGGACTAGTTGAACAAGGTGTCCTTGATGACA  
4501 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4560

TGTTTTTCATTACAACGTTACCTAGATAGACCTGATCAACTTGTCCACAGGAACACTCTGT  
K S N V A M D L S G L V E Q G V L D D  
M -

TGAAACTAGATGATGCTGCTCAAGAAGAAATCTAAAAATACTTATGCAAAACAACAACA  
4561 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4620

ACTTTGATCTACTACGACGAGTTCCTCTTTAAGATTTTTATGAATACGTTTTTGTGTGTGT  
K L D D A A Q E E I L K I L M Q N N N  
I -

TTATAAGTAGAGAATCACAAAAGCAAATTTTTACACGAGCAGATCATATTATTGAAATTG  
4621 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4680

AATATTCATCTCTTAGTGTTTTCGTTAAAAATGTGCTCGTCTAGTATAATAACTTTAAC  
I S R E S Q K Q I F T R A D H I I E I  
E -

AAAATAAAAACACACAACCAATTAGAGAAACCATAGCTTGGATTTTGGCTGCTAGTGGAA  
4681 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4740

TTTTATTTTTGTGTGTTGGTTAATCTCTTTGGTATCGAACCTAAAACCGACGATCACCTT  
N K N T Q P I R E T I A W I L A A S G  
T -

CATTTTTTACTCTTATTTTGGCTCTATCGCACTTCTTTTGTCTGTCAAGCAAGGACAAG  
4741 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 4800

GTAAAAAATGAGAATAAAACGAGATAGCGTGAAAGAAAACAAGACAGTTTCGTTCTGTTTC  
F F T L I L L Y R T F F C S V K Q G Q  
G -

Anhang

---

GACCGTATGACGGGAAAAATAGCAAACCCCGTCAATTCAAAGAGATTCTCGCTCAAGCTC  
4801 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4860

CTGGCATACTGCCCTTTTATCGTTTTGGGGCAGTTAAGTTTCTCTAAGAGCGAGTTCGAG  
  
P Y D G K I A K P R Q F K E I L A Q A  
P -

CAGATCTTGAATTGGCTGTTCTAAGAAACTGTGTTCCACTTGATGTAGATATTCCTAATA  
4861 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4920

GTCTAGAACTTAACCGACAAGATTCTTTGACACAAGGTGAACTACATCTATAAGGATTAT  
  
D L E L A V L R N C V P L D V D I P N  
K -

AACCTAAAATGATGCCATTTACTGCTCTAGGACTTTTTGAATTGACATTTGCTACAAACA  
4921 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 4980

TTGGATTTTACTACGGTAAATGACGAGATCCTGAAAACTTAACTGTAAACGATGTTTGT  
  
P K M M P F T A L G L F E L T F A T N  
R -

GACATGCTATTGAAAATTGCACTTCATTTGAAATCCAAGGTACACATATAAAATGAAAG  
4981 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 5040

CTGTACGATAACTTTTAACTGAAGTAACTTTAGGTTCCAGTGTGTATATTTAACTTC  
  
H A I E N C T S F E I Q G H T Y K I E  
D -

ATGTAGATGTGAAAATGGTTTCTACACAGGATGGAAAACTGATTTGGCTATAGTTACAC  
5041 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 5100

TACATCTACACTTTTACCAAAGATGTGTCTACCTTTTTGACTAAACCGATATCAATGTG  
  
V D V K M V S T Q D G K T D L A I V T  
L -

TAAAGAAAGGAACAGATTTAGAAATATCATGAAACATCTACTGGATGAGATTATTGAAC  
5101 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
-- + 5160

ATTTCTTTCCTTGGTCTAAATCTTTATAGTACTTTGTAGATGACCTACTCTAATAACTTG  
  
K K G T R F R N I M K H L L D E I I E  
P -

CAACAGGACATGTAGTAGGAATTGTCAATTCTAGTTTGTTCCTCCCGAACACTTTTTAAAG  
5161 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5220

GTTGTCCTGTACATCATCCTTAACAGTTAAGATCAAACAAGGGGCTTGTGAAAAATTC  
G - T G H V V G I V N S S L F P R T L F K

GAAAAGCACTAAGGACTGCAAGAAAGATTACAGCTTCTGGTAAACAAATGTACAATGTTT  
5221 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5280

CTTTTCGTGATTCTGACGTTCTTTCTAATGTCTGAAGACCATTGTGTTACATGTTACAAA  
F - K A L R T A R K I T A S G K Q M Y N V

TCTCTTATGACTGTCCAACCTTATGGTGGATACTGTGGTGGCCCTATAATTGGGCAAGTTG  
5281 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5340

AGAGAATACTGACAGGTTGAATACCACCTATGACACCACGGGGATATTAACCCGTTCAAC  
G - S Y D C P T Y G G Y C G A P I I G Q V

GGAATGAAAAGAAAATCTTGAATACACTGTGCTGGTGTGGCCTACAGGATGGGCTA  
5341 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5400

CCTTACTTTTTTTTTAAGAACCTTATGTGACACGACCACTACCGTGATGCTTACCCGAT  
T - N E K K I L G I H C A G D G T T G W A

CTGTATTACAAAAACATTTGTTAAGAAAATTGAAGAACAAGGGCTTAAAGTTCCTACTTG  
5401 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5460

GACAATAATGTTTTTTGTAACAATCTTTTAACTTCTTGTTCCTCCGAATTTCAAGGTGAAC  
G - V I T K N I V K K I E E Q G L K V P L

GTGAAGCAAATCCAGTTTGTTCATGTAATGAGAAAATCCAAAATTTGCCCTTCAGGGTTTT  
5461 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5520

CACTTCGTTTAGGTCAAACAGTACATTACTCTTTTAGGTTTTAAACGGGAAGTCCCAAAA

Anhang

---

S - E A N P V C H V M R K S K I C P S G F

CCTATCCAAC T G A T G T A G A A C C T G C T A T C C T T A C C C A G A A A G A T C C C A G A C T T G A T G A T G  
5521 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5580

G G A T A G G T T G A C T A C A T C T T G G A C G A T A G G A A T G G G T C T T T C T A G G G T C T G A A C T A C T A C

G - Y P T D V E P A I L T Q K D P R L D D

G T G T T G T T C T T G A C G A T A A A A T T T T T G A A A A C A T C A A A A T A A C A T G G A A A C A C T T C C A C  
5581 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5640

C A C A A C A A G A A C T G C T A T T T T A A A A C T T T T T G T A G T T T T A T T G T A C C T T G T G A A G G T G

P - V V L D D K I F E K H Q N N M E T L P

C A G T T T T G A A G T A G C A G C A A A A A T G T A T G C T A A G C A G G T G T T C T C T A T T G T T G G G A A A G  
5641 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5700

G T C A A A A A C T T C A T C G T C G T T T T T A C A T A C G A T T C G T C C A C A A G A G A T A A C A A C C C T T T C

D - V F E V A A K M Y A K Q V F S I V G K

A C A A T G A G G C A A T T C A A C A A C T G A A G C T A T A A A T G G G T A T A A G A C T G C A G A G A A A A T G G  
5701 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5760

T G T T A C T C C G T T A A A G T T G T T G A C T T C G A T A T T T A C C C A T A T T C T G A C G T C T C T T T T A C C

D - N E A I S T T E A I N G Y K T A E K M

A T C T G T C T A C A T C T C C T G G A T A T C C A T A T G T T A A C A T G G G A T T G A G A A G A G A A A A C A T G C  
5761 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5820

T A G A C A G A T G T A G A G A C C T A T A G G T A T A C A A T T G T A C C C T A A C T C T T C T C T T T T G T A C G

L - L S T S P G Y P Y V N M G L R R E N M

T T G A T A T T G T T G A T G G T G T C T A T G T C C C A A A G A A T G G T T C A A T A A A A A T A T T A T T G C T G  
5821 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5880

A A C T A T A A C A A C T A C C A G A T A C A G G G T T T T C T T A C C A A G T T A T T T T T A T A A T A A C G A C

Anhang

---

V -           D I V D G V Y V P K E W F N K N I I A

TTGAGGAAGATCCAAAAGATTCAACATTTGCTACTTTTCTTAAAGATGAACTTAGACCCA  
5881 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 5940

AACTCCTTCTAGGTTTTCTAAGTTGTAAACGATGAAAAGAATTTCTACTTGAATCTGGGT

I -           E E D P K D S T F A T F L K D E L R P

TTGCCAAAGCCAGGAGTGAAAAGACTAGAATTGTTGATGCATCTCCGTTTTGTGTCATGCTA  
5941 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6000

AACGGTTTCGGTCTCACCTTTCTGATCTTAACAACACTAGTAGAGGCAAAACAGTACGAT

I -           A K A R S G K T R I V D A S P F C H A

TAGTAGGAAGAAAACCTTCTATTGAAATTCACTGAAAAGTTTATGGTTAATAATGGGACGT  
6001 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6060

ATCATCCTTCTTTTGAAGATAACTTTAAGTGACTTTTCAAATACCAATTATTACCCTGCA

S -           V G R K L L L K F T E K F M V N N G T

CTGTGGGTTCTGCTATTGGTACGGATCCAGACTGTGATTGGACACGATTTTACCATGAAC  
6061 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6120

GACACCAAGACGATAACCATGCCTAGGTCTGACACTAACCTGTGCTAAAATGGTACTTG

L -           V G S A I G T D P D C D W T R F Y H E

TTTCTAATGAGTATGTTTTGATTTGGATTATTTCTCAATTTGATTCAACACACCTACTG  
6121 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6180

AAAGATTACTCATACAAAAACTAAACCTAATAAGAGTTAAACTAAGTTGTGTTGGGATGAC

A -           S N E Y V F D L D Y S Q F D S T H P T

CAATGTTTGATCTTGTAAAAAAACACTTCTTCAGTATAGAAAACGGATTTGATGATAAAA  
6181 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6240

GTTACAACTAGAACATTTTTTTGTGAAGAAGTCATATCTTTTGCCTAAACTACTATTTT

T - M F D L V K K H F F S I E N G F D D K

CAGGTAAATATCTGGACTCACTTTCTATTTCAAACATGTGTATGGAAGAGAAAAGTTT

6241 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6300

GTCCATTATAGACCTGAGTGAAAGATAAAGTTTTGTACACATACCTTCTCTTTTCAAAA

L - G K Y L D S L S I S K H V Y G R E K F

TGACAGTTGGTGGTCTACCATCAGGATGCAGTTGTACTTCAATGCTGAATACTGTTTTTA

6301 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6360

ACTGTCAACCACCAGATGGTAGTCTACGTCAACATGAAGTTACGACTTATGACAAAAAT

N - T V G G L P S G C S C T S M L N T V F

ATAACATAATAATAAGAGCTGCAATTCTTTCTTGTATGAAGGTGTTGATTGGAGTGATT

6361 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6420

TATTGTATTATTATCTCGACGTTAAGAAAGAACAATACTTCCACAATAACCTCACTAA

F - N I I I R A A I L S C Y E G V D W S D

TTAAAATGCTTCTTATGGTGATGATGTGGTGTATTCTTCTAGAGATCCTATTCTTCCAG

6421 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6480

AATTTTACGAACGAATACCACTACTACCCACATAAGAAGATCTCTAGGATAAGAAGGTC

G - K M L A Y G D D V V Y S S R D P I L P

GGAAAATTGCTAATTGGCTACACAAAAATACAACCTACAACCTAACCCAGCAAACAAA

6481 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6540

CCTTTTAACGATTAACCGATGTGTTTTTATGTTGAATGTTTGATTGAGGTCGTTTGT

T - K I A N W L H K N T T Y K L T P A N K

CTAGTAACTTTCCAACAGAGTCAAAAATTGAAGATGTCACCTTCTTGAAGAGAAAAGTTG



# Anhang

---

6901 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 6960

AAATTTAATTTAAAACCTTTAAAATTTAAAATTAATGAAAACTAAACAATGTAATTAACAA

TAGATGATTAAGTTTATGTTAATTTTATTAATCATTTTTATTAAATTAGAATAAATTAT  
6961 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 7020

ATCTACTAATTCAAAATACAATTAAAATAATTAGTAAAAATAATTTAATCTTATTTAATA

ATAAGATATAATTTTAAGTTAGATTATATATTAGTTAATTTAGTTTAGTTTAAAAGCAAA  
7021 -----+-----+-----+-----+-----+-----  
--+ 7080

TATTCATATTTAAAATTC AATCTAATATATAATCAATTAATCAAATCAAATTTTCGTTT

aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa  
7081 -----+-----+----- 7105  
ttttttttttttttttttttttttt

“Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der “Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis” niedergelegt sind, eingehalten.”

Gießen, den 28.07.2011

Wenke Heuser

## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. E. F. Kaleta danke ich für die Überlassung des Themas und für die gute, hilfsbereite und geduldige Betreuung und Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. G. Keil, Friedrich-Loeffler-Institut, Insel Riems danken für die Sequenzierung eines Isolates, ohne ihn wäre dies nicht möglich gewesen. Herrn Dr. W. Herbst, Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, Justus-Liebig-Universität Gießen, danke ich für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen und für seine guten Ideen. Frau Dr. H. Pendl, Pendlab, Steinhausen, Schweiz, fertigte die histologischen Präparate an, dafür danke ich ihr. Bei Frau P.D. Dr. Rachel Marschang möchte ich mich für die umfassende Hilfeleistung bei allen Fragen bedanken. Außerdem möchte ich mich noch bei Herrn W. Pfeiffer bedanken für die immer währende Bereitschaft der Probennahme bei seinen Tieren.

Unseren TA's Sandra und Julia danke ich für die Unterstützung und Hilfe bei der Einarbeitung in das Arbeiten mit Zellkulturen. Dagmar danke ich für die Hilfe im Kampf gegen den Computer. Dominik danke ich für seinen Optimismus in jeder Situation. Bedanken möchte ich mich beim gesamten Team der Vogelklinik für die gute Zusammenarbeit und die schöne Atmosphäre.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.





**ISBN 978-3-86345-076-2**



**Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft Service GmbH**  
35392 Gießen · Friedrichstraße 17 · Tel. 0641 / 24466 · Fax: 0641 / 25375  
e-mail: [info@dvg.net](mailto:info@dvg.net) · Homepage: <http://www.dvg.de>