

Aus der Klinik für Fische und Reptilien
(Kommissarischer Leiter Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. R. Korbel)
im Zentrum für Klinische Tiermedizin
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. M. El-Matbouli

**Inclusion body disease (IBD) -
Ein Vergleich von Blutausstrich und Leberbiopsie im Hinblick
auf die diagnostische Aussagekraft**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Melanie Keilwerth
aus Eriskirch

München 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. El-Matbouli
Korreferent: Prof. Dr. Kaltner

Tag der Promotion: 24. Juli 2010

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IX
Abkürzungsverzeichnis	X
1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	2
2.1 Taxonomie der Schlangen.....	2
2.2 Einschlusskörperchenkrankheit.....	6
2.2.1 Definition.....	6
2.2.2 Geschichtliches.....	6
2.2.3 Ätiologie.....	7
2.2.4 Pathogenese.....	8
2.2.5 Klinik.....	9
2.2.6 Pathologie.....	12
2.2.7 Diagnose.....	19
2.2.8 Differentialdiagnose.....	22
2.2.9 Therapie.....	23
2.2.10 Prophylaxe.....	24
2.3 Viren.....	26
2.3.1 Viren allgemein.....	26
2.3.1.1 Allgemeiner Aufbau.....	26
2.3.1.2 Allgemeine Taxonomie.....	27
2.3.1.3 Virusvermehrung.....	27
2.3.1.4 Virusdiagnostik.....	28
2.3.1.5 Therapie und Prophylaxe.....	29
2.3.2 Retroviren allgemein.....	31
2.3.2.1 Taxonomie.....	31
2.3.2.2 Eigenschaften und Morphologie.....	32
2.3.2.3 Genomorganisation und Replikation.....	34
2.3.2.4 Übertragung, Verlauf und Diagnose.....	35
2.3.3 Retroviren bei Boiden.....	37

2.3.3.1	Retroviren bei Boiden in Verbindung mit Neoplasien.....	39
2.3.4	Retroviren bei Nichtboiden meist in Verbindung mit Neoplasien.....	41
3	Material und Methoden	46
3.1	Untersuchte Tiere	46
3.2	Klinische Allgemeinuntersuchung	48
3.3	Blutentnahme	49
3.4	Blutausstrich.....	49
3.5	Hämatologie	51
3.6	Leberbiopsie	52
3.7	Sektion.....	53
3.8	Vorbereitungen für die histologische Untersuchung.....	55
3.9	Probenaufbereitung für die Elektronenmikroskopie	57
3.10	Kunststoffeinbettung und Schnittanfertigung	58
3.11	Färbeprotokolle für Blutausstriche.....	60
3.11.1	Diff-Quik® (Modifizierte Pappenheimfärbung).....	60
3.11.2	Giemsa.....	60
3.12	Färbeprotokolle für Paraffinschnitte	61
3.12.1	Hämatoxylin-Eosin (HE).....	61
3.12.2	Giemsa.....	61
3.12.3	PAS (Periodic-Acid Schiff Reaktion)	62
3.13	Färbeprotokoll für Semidünnschnitte.....	63
3.13.1	Toluidinblau	63
3.14	Färbeprotokolle für Kunststoffschnitte	63
3.15	Darstellung der Farbkomponenten	64
3.15.1	DiffQuik	64
3.15.2	Giemsa.....	65
3.15.3	Hämatoxylin-Eosin (HE).....	65
3.15.4	PAS (Periodic-Acid Schiff Reaktion)	66
3.15.5	Toluidinblau	66
3.16	Statistik.....	67
4	Ergebnisse	68
4.1	Tiere	68
4.2	Klinische Allgemeinuntersuchung	71
4.3	Blutausstrich.....	76

4.3.1	Darstellung der Einschlusskörperchen	79
4.3.1.1	DiffQuik	79
4.3.1.2	Giemsa.....	81
4.4	Hämatologie	83
4.5	Leberbiopsie	85
4.6	Sektion/ Histopathologie	87
4.6.1	Darstellung der Einschlusskörperchen	95
4.6.1.1	Hämatoxylin-Eosin (HE).....	95
4.6.1.2	Giemsa.....	100
4.6.1.3	PAS (Periodic-Acid Schiff Reaktion)	102
4.6.1.4	Toluidinblau	103
4.6.2	Darstellung einer Leberbiopsiewunde.....	106
4.7	Elektronenmikroskopie	107
5	Diskussion	112
5.1	Einschätzung der IBD Situation	112
5.2	Beurteilung der klinischen Symptome	114
5.3	Bewertung der Untersuchungsmethoden	115
5.3.1	Blutausstrich.....	116
5.3.2	Leberbiopsie	117
5.3.3	Blutausstrich im Vergleich zur Leberbiopsie.....	120
5.4	Bewertung der Leukozytenzahlen	121
5.5	Beurteilung der histopathologischen Befunde	122
5.6	Beurteilung der elektronenmikroskopischen Untersuchung.....	125
6	Zusammenfassung	127
7	Summary	128
8	Literaturverzeichnis	129
	Danksagung	136

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Morphologie der Typ-A-, -B-, -C- und -D-Retroviruspartikel (Liebermann 1992).....	32
Abbildung 2: Replikation der Retroviren (nach Gelderblom)	35
Abbildung 3: Prävalenz von IBD bei Boas (n=17) und Pythons (n=9) mit 95 % Konfidenzintervall.....	69
Abbildung 4: Prävalenz der Einschlüsse bei Boas (n=13) mit 95 % Konfidenzintervall in den verschiedenen Blutzellen.....	78
Abbildung 5: Dieser Blutausstrich stammt von einer IBD positiven <i>Boa constrictor imperator</i> (Nr. 2). Im linken Bild sind zwei homogen gräuliche, runde, intrazytoplasmatische Einschlusskörper in einem Erythrozyten (→) mit einem Durchmesser von ca. 2 µm bzw. 3,5 µm (DiffQuik, 400fache Vergrößerung) zu sehen. Das rechte Bild zeigt einen Lymphozyt mit einem homogenen, lila gefärbten Einschluss (→), dessen Durchmesser ungefähr 4,5 µm beträgt. Das Zytoplasma ist durch diesen - bis auf einen kleinen Rest oben - völlig verdrängt und der Zellkern ist eingedrückt (DiffQuik, 1000fache Vergrößerung).	79
Abbildung 6: Dieser Blutausstrich stammt von einer IBD positiven männlichen <i>Boa constrictor imperator</i> (Nr. 4) und zeigt einen homogenen, runden, gräulichen, intrazytoplasmatischen Einschlusskörper in einem Erythrozyten (→). Er weist einen Durchmesser von ca. 3 µm auf. Großes Bild: DiffQuik, 400fache Vergrößerung. Das kleine rechte Eckbild zeigt denselben Einschlusskörper in 1000facher Vergrößerung.....	80
Abbildung 7: Der Blutausstrich stammt von derselben IBD positiven männlichen <i>Boa constrictor imperator</i> (Nr. 4). In diesem Lymphozyt befindet sich ein Einschlusskörper (→), der sich homogen im Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten darstellt. Der Zellkern (ZK) ist dadurch nur leicht eingedrückt. (DiffQuik, 400fache bzw. im Ausschnitt 1000fache Vergrößerung). Der Durchmesser des Einschlusses beträgt ca. 6 µm.	80
Abbildung 8: In dieser Abbildung ist ein Thrombozyt mit einem homogenen, runden, grau-blauen Einschlusskörper (→) mit einem ungefähren Durchmesser von 2,5 µm zu sehen (DiffQuik, 400fache Vergrößerung). Der Bildausschnitt zeigt diesen nochmals in 1000facher Vergrößerung. Der Ausstrich stammt von einer IBD positiven weiblichen <i>Boa constrictor</i> (Nr. 5).	81

Abbildung 9: Dieser Ausstrich stammt von einer männlichen, IBD positiven *Boa constrictor imperator* (Nr. 4). Das Bild zeigt einen homogenen, runden, hellblauen Einschluss (→) im Zytoplasma des Erythrozyten. Der Durchmesser des Einschlusskörperchens beträgt ca. 2 µm. (Giemsa, 400fache Vergrößerung). Im Bildausschnitt ist der Einschluss nochmals in näherer Vergrößerung zu sehen (1000fach). 82

Abbildung 10: Diese lichtmikroskopische Aufnahme zeigt einen homogenen, hellblauen Einschlusskörper (→), schön abgegrenzt innerhalb des Zytoplasmas (ZP) eines Lymphozyten. Der Zellkern (ZK) ist durch diesen leicht eingedrückt (Giemsa, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Im Durchmesser mißt der Einschluss ca. 3 µm. Der Ausstrich gehört zu derselben IBD positiven, männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 4) wie oben. 82

Abbildung 11: Obige Abbildung zeigt einen homogenen, runden, blaugrauen Einschluss im Zytoplasma eines Thrombozyten (→), mit einem Durchmesser von ca. 2 µm. (Giemsa, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Der Ausstrich wurde vom Blut einer IBD positiven, weiblichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 3) angefertigt. 83

Abbildung 12: Prävalenz der Einschlüsse bei Boas (n=13) mit 95 % Konfidenzintervall in den verschiedenen Organen..... 91

Abbildung 13: A: Dieser Bildausschnitt zeigt die typischen Einschlusskörperchen (→) in den Hepatozyten mit einem Durchmesser von bis zu 5,4 µm (HE, 400fache Vergrößerung). Im kleinen rechten Eckbild sind 2 Einschlüsse stärker vergrößert (1000fach) 95

Abbildung 14: B-G: Bild **B** stellt einen Teil der Niere dar, in dem Einschlüsse in den Tubulusepithelzellen vorkommen, mit einem Durchmesser von ca. 2,5-4,5 µm (HE, 400fache Vergrößerung). In Bild **C** sind zahlreiche Einschlüsse mit einem Durchmesser von bis zu 6 µm im Pankreasparenchym zu finden (HE, 400fache Vergrößerung). Bild **D** zeigt einen kleinen Ausschnitt des Lungenepithels mit Einschlusskörperchen mit einem Durchmesser bis 5 µm (HE, 400fache Vergrößerung). Aufnahme **E** zeigt einige Einschlüsse im Schilddrüsenepithel, deren Durchmesser bis zu 4,5 µm betragen (HE, 400fache Vergrößerung). Bild **F** stellt Milzlymphozyten mit Einschlüssen dar, deren Durchmesser bis zu 2,8 µm messen (HE, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). In Bild **G** sind Einschlusskörper im Magendrüsenepithel zu sehen, deren Durchmesser ungefähr zwischen 3,5 und 6,3 µm liegt (HE, 400fache Vergrößerung). 96

Abbildung 15: H-K: Der Dünndarmausschnitt **H** zeigt Einschlüsse, die einen Durchmesser von bis zu 4,5 µm erreichen (400fache Vergrößerung). Aufnahme **I** stammt vom Dickdarm und zeigt Einschlusskörper mit einem Durchmesser von bis zu 5 µm (400fache Vergrößerung). In Bild **J** ist ein Ausschnitt der Muskulatur abgebildet, in dem sich Einschlüsse befinden, deren Durchmesser bis zu ca. 4,5 µm erreichen (400fache Vergrößerung). Und Aufnahme **K** stellt einen Einschluss im Gehirn dar, der im rechten Eckbild nochmals vergrößert ist (400fache bzw. 1000fache Vergrößerung), mit einem Durchmesser von ungefähr 5 µm. Alle oben genannten Bilder (A-K) wurden mit der HE-Färbung gefärbt. 97

Abbildung 16: Auf diesem Bild sind multiple, intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörperchen (→) in den Hepatozyten einer IBD positiven, weiblichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 25) abgebildet, deren Durchmesser bis zu 5 µm betragen. Außerdem sind einige Fettvakuolen (V) im Lebergewebe zu erkennen. Im unteren rechten Eckbild liegt ein Einschluss nahe neben einem Zellkern (ZK). HE-Färbung, Kunststoffschnitt. 98

Abbildung 17: Diese Abbildung stammt von einer IBD positiven, männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 26), die zusammen mit dem oben erwähnten Weibchen zusammenlebte und ebenfalls eine ausgeprägte Fettleber aufwies (Fettvakuolen V). In den Hepatozyten befinden sich multipel verteilte, intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlüsse (→), welche einen Durchmesser von bis zu 5 µm aufweisen. Das kleine rechte Eckbild zeigt eine vergrößerte Aufnahme des Lebergewebes. Auch hier sind Einschlüsse z. T. in der Nähe eines Zellkerns (ZK) zu erkennen. HE-Färbung, Kunststoffschnitt..... 99

Abbildung 18: Diese Aufnahme zeigt eine Fettleber mit homogen graublauen, runden Einschlüssen (→), deren Durchmesser bis zu 5 µm messen (Giemsa, 400fache Vergrößerung). Das rechte Eckbild zeigt einen näher vergrößerten Einschlusskörper in einem Hepatozyt (1000fache Vergrößerung). 100

Abbildung 19: Im linken Bild sind die homogenen, blauen, rundlichen Einschlusskörper (→) im Nierentubulusepithel zu finden. Ihr Durchmesser liegt zwischen 3,0 und 4,6 µm (400fache Vergrößerung). Die rechte lichtmikroskopische Aufnahme zeigt zahlreiche Einschlüsse (→) im Pankreas, deren Durchmesser teilweise bis zu 5 µm betragen (Giemsa, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung)..... 101

Abbildung 20: Hier ist ein Ausschnitt der Milz abgebildet. In den Lymphozyten befinden sich teilweise kleine Einschlusskörper (→) mit einem Durchmesser von bis zu 2,3 µm. Zusätzlich fällt eine ausgeprägte Heterophileninfiltration auf (Giemsa, 400fache Vergrößerung). 101

Abbildung 21: Hier sind vereinzelt Einschlusskörper (→) in der Fettleber zu finden. Diese stellen sich homogen, rund und graurosa dar. Ihr Durchmesser reicht von ca. 1,8 bis 3,6 µm (PAS, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). 102

Abbildung 22: Diese Aufnahme zeigt das Pankreas mit zahlreichen PAS-negativen Einschlüssen (→), deren Durchmesser von ca. 3,6 bis 6,3 µm reicht (PAS, 400fache Vergrößerung). 103

Abbildung 23: Im Lebergewebe, das mit Fettvakuolen durchsetzt ist, liegen vereinzelt die runden, bläuliche bzw. blauen Einschlusskörperchen (→). Ihr Durchmesser beträgt ca. 2,7 µm (Toluidinblau, 400fache Vergrößerung). In der kleinen rechten Abbildung weisen die Einschlüsse eine polymorphe Form auf, besitzen aber eine homogene Struktur. Ihr Durchmesser mißt rund 4,1 µm (1000fache Vergrößerung). 104

Abbildung 24: A-D: Aufnahme **A** zeigt einen Milzausschnitt mit zahlreichen Einschlusskörperchen (→) in den Lymphozyten. Der Durchmesser dieser homogenen, blau gefärbten, runden Einschlüsse reicht von 0,9 bis 3,6 µm (400fache Vergrößerung). Im kleineren, rechten Bild sind die Einschlusskörperchen (→) in stärkerer Vergrößerung zu sehen, deren Durchmesser bis zu 3,1 µm betragen (1000fache Vergrößerung). Zum Teil sind die Zellkerne durch die Einschlusskörper eingedrückt. In der Abbildung **B** stellen sich die Einschlüsse (→) in der Niere dar (Durchmesser bis zu 8 µm) (400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Im Bild **C** zeigen sich besonders viele Einschlüsse (→) im Pankreas. Der Durchmesser der teils ovalen, homogenen Einschlusskörperchen beträgt bis zu 6,4 µm (400fache Vergrößerung). Im Ausschnitt **D** vom Rückenmark ist ein Einschlusskörper (→) mit einem Durchmesser von ca. 4,5 µm zu sehen (400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Alle oben genannten Präparate (A-D) wurden mit Toluidinblau gefärbt. 105

Abbildung 25: Die Aufnahme zeigt die Leber einer männlichen, IBD positiven *Boa constrictor* (*Boa constrictor imperator*) (Nr. 4), bei der ca. 3 Wochen vor dieser Sektion eine Leberbiopsie entnommen wurde. Die Narbe (→) liegt reizlos im Gewebe und ist gut abgeheilt. 106

Abbildung 26: Dies ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von der Leber einer IBD positiven weiblichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 3). Im Zytoplasma liegt ein Einschlusskörperchen (→) in unmittelbarer Nähe zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und nahe des Zellkerns (ZK). Im Inneren des Einschlusses befinden sich Vakuolen, welche Innenstrukturen aufweisen. Weiterhin ist eine Fettvakuole (V) zu sehen. Der Durchmesser des Einschlusses beträgt ungefähr 3,8 µm (8900 x Vergrößerung). 107

Abbildung 27: Dies ist die Vergrößerung des oben abgebildeten Einschlusses in der Leber von Boa Nr. 3. Innerhalb der Vakuolen liegen z. T. elektronendichte Partikel (→). Insgesamt ist eine granuläre, aber homogene Struktur des Einschlusses zu erkennen. (26900 x Vergrößerung).	108
Abbildung 28: Dies ist eine elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von einigen Lymphozyten der Milz mit je einem homogenen Einschluss (→), der z. T. den Zellkern (ZK) eindrückt. Deren Durchmesser liegt zwischen 1,0 und 2,4 µm. Am unteren Bildrand lässt sich ein Einschlusskörperchen erkennen, das Vakuolen mit kleinen Strukturen im Inneren aufweist. Es sind auch einige Fettvakuolen (V) im Gewebe verteilt. Das Präparat stammt von Boa Nr. 4 (7500 x Vergrößerung).	108
Abbildung 29: Der Ausschnitt zeigt einen der vorher abgebildeten Einschlüsse in einem Milzlymphozyt in näherer Vergrößerung (41500 x). Am Rand des Einschlusskörpers (EK) sind runde, elektronendichte Abschnürungs- oder Anlagerungsformen (→) zu sehen. Das granulär erscheinende Einschlusskörperchen drückt den Zellkern (ZK) deutlich ein. Im Zytoplasma des Lymphozyten befinden sich noch Mitochondrien (M).	109
Abbildung 30: Dies ist die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Einschlusskörperchens (EK) in der Niere von Boa Nr. 3. Es enthält zahlreiche, unterschiedlich große Vakuolen (→) mit elektronendichten Innenstrukturen und einem Durchmesser von 3,6 µm. Das Einschlusskörperchen ist von Mitochondrien (M) und Lipidtröpfchen (L) umgeben (16700 x Vergrößerung).	109
Abbildung 31: Hier ist der obige Einschlusskörper (EK) stärker vergrößert (41500 x). In den vielen Vakuolen ist z. T. die hexagonale Form der zahlreichen, elektronendichten Viruspartikel (→) im Inneren zu erkennen. Am Rand des Einschlusskörpers befinden sich Mitochondrien (M).	110
Abbildung 32: Dies ist die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Einschlusskörpers (→) im Pankreas von Boa Nr. 3. Er weist einige Vakuolen unterschiedlicher Größe im Inneren auf, die kleine, elektronendichte Partikel enthalten. Ein Zellkern (ZK) und Fettvakuolen (V) sind ebenfalls abgebildet (13400 x Vergrößerung).	110
Abbildung 33: Bei näherer Vergrößerung der vorherigen Abbildung sind elektronendichte, hexagonale Viruspartikel (→) in den Vakuolen des Einschlusses zu erkennen. Im Randbereich sind einige runde Abschnürungs- bzw. Anlagerungsformen erkennbar (41500 x Vergrößerung).	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ein Überblick über die Tiere, die im Rahmen der Dissertation untersucht worden sind	47
Tabelle 2: Durchgeführte Färbungen bei den Blutausstrichen	50
Tabelle 3: Überblick über die durchgeführten Leberbiopsien bzw. Sektionen bei den Schlangen	54
Tabelle 4: Durchgeführte Färbungen bei den histologischen Präparaten.....	56
Tabelle 5: Proben für die elektronenmikroskopische Untersuchung von folgenden Tieren...	58
Tabelle 6: Färbeergebnisse bei den Blutausstrichpräparaten (DiffQuik)	64
Tabelle 7: Färbeergebnisse bei den Blutausstrichpräparaten (Giemsa)	65
Tabelle 8: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten (Giemsa)	65
Tabelle 9: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten (HE)	65
Tabelle 10: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten (PAS)	66
Tabelle 11: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten (Toluidinblau).....	66
Tabelle 12: Überblick über die Verteilung der positiven und negativen Tiere	70
Tabelle 13: Übersicht der aufgetretenen Symptome bei den Boas.....	73
Tabelle 14: Übersicht der aufgetretenen Symptome bei den Pythons.....	75
Tabelle 15: Verteilung der Einschlusskörperchen (EK) in den verschiedenen Blutzellen im Blutausstrich.....	77
Tabelle 16: Färbeergebnisse in den Blutausstrichen (DiffQuik).....	79
Tabelle 17: Färbeergebnisse in den Blutausstrichen (Giemsa)	81
Tabelle 18: Leukozyten- und Erythrozytenwerte der Schlangen	84
Tabelle 19: Blutwerte von einigen Schlangen ca. 24 Stunden nach der Leberbiopsie	85
Tabelle 20: Übersicht über durchgeführte (verwertbare) Nadel- bzw. Keilbiopsien	86
Tabelle 21: Gesamtüberblick der durchgeführten Untersuchungen mit Ergebnis	88
Tabelle 22: Verteilung der Einschlusskörperchen (EK) in den verschiedenen Organen der positiven Schlangen.....	90
Tabelle 23: Übersicht der histopathologischen Veränderungen bei den Boas	93
Tabelle 24: Übersicht der histopathologischen Veränderungen bei den Pythons	94
Tabelle 25: Färbeergebnis bei den histologischen Präparaten (HE)	95
Tabelle 26: Färbeergebnis bei den histologischen Präparaten (Giemsa)	100
Tabelle 27: Färbeergebnis bei den histologischen Präparaten (PAS)	102
Tabelle 28: Färbeergebnis bei den histologischen Präparaten (Toluidinblau)	103

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
ALV	aviäres Leukosevirus
bds.	beidseits
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
cDNA	complementary desoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
cm ³	Kubikzentimeter
CSRV	Corn Snake Retrovirus
dest.	destilatum
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
ds	double stranded, Doppelstrang
ed.	Editor
EK	Einschlusskörper
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay, enzymgebundener Immunadsorptionstest
et al.	et altera
evtl.	eventuell
EZ	Ernährungszustand
G	Gauge
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
ggrd.	geringgradig
GIT	Gastrointestinaltrakt
GMA	glycol methacrylate (engl.), Glycolmethacrylat (dt.)
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
HE	Hämatoxylin-Eosin Färbung
hgrd.	hochgradig
Hrsg.	Herausgeber
HTLV	humanes T-Zell Leukämievirus

IBD Inclusion body disease
i.d.R. in der Regel
I.E. Internationale Einheiten
ICTV International Committee on Taxonomy of Viruses
IgG Immunglobulin G
kD Kilodalton
KI Konfidenzintervall
kV Kilovolt
LTR long terminal repeat
M Molar
mgrd. mittelgradig
MHz Megahertz
min. Minute
Mio. Millionen
ml Milliliter
MLV murines Leukämievirus
mm Millimeter
MMA methyl methacrylate (engl.), Methylmethacrylat (dt.)
mRNA messenger RNA
N Normal
NaCl Natriumchlorid
nm Nanometer
Nr. Nummer
NRTI nucleosid reverse transcriptase inhibitor
op operationem, Operation
PAS Periodic-Acid Schiff, Perjodessigsäure-Schiff-Reaktion
PCR Polymerase-chain-reaction
pers. persönliche
pH pH-Wert
PMV Paramyxovirus
post nach
prä vor
probl. Problem
PTAH Hämatoxylin-Phosphorwolframsäure nach Mallory

red.	reduziert
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RV	Retrovirus
S	Svedberg
s.	siehe
spp.	Subspezies
ss	single-stranded, Einzelstrang
st.	Störungen
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
u. a.	unter anderem
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
VH2	Viper heart cells 2
VRV	Viper Retrovirus
VSP	viral structural polypeptide, Virusstrukturpolypeptide
VSW	Vipera spleen warm, Viper-Milz-Zelllinie
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem, zentralnervös

1 Einleitung

Die Exotenhaltung erfreut sich stetig wachsender Beliebtheit. Deshalb werden auch in der Tierarztpraxis immer häufiger Reptilien vorgestellt, deren Besitzer v. a. durch das Internet oft gut informiert sind. So haben die Halter von Riesenschlangen konkrete Vorstellungen darüber, worauf ihre Tiere untersucht werden sollen. Unter anderem wird die gezielte Untersuchung auf die Einschlusskörperchenerkrankung („Inclusion body disease“, IBD) gewünscht, da sich die Nachricht vom „Schlangen-AIDS“ unter den Haltern schnell herum-spricht und im Internet davor gewarnt wird. Die Tiere zeigen dabei oft Regurgitation und häufig auch zentralnervöse Störungen, wobei es keine pathognomonischen Anzeichen für diese Erkrankung gibt. Als diagnostische Maßnahmen hierfür gelten die Beurteilung von Blutaussstrichen und Organbiopsien, wobei auf die typischen Einschlusskörperchen geachtet wird. Über die Ätiologie der Krankheit ist allerdings noch wenig bekannt.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist der Vergleich von Blutaussstrichen und Leberbiopsien im Hinblick auf das Vorhandensein solcher intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen, welche für IBD charakteristisch sind. Es soll untersucht werden, inwiefern eine Aussage über ein IBD positives bzw. negatives Ergebnis getroffen werden kann, ob u. U. eine alleinige Beurteilung von Blutaussstrichen ausreicht oder zwingend eine zusätzliche Leberbiopsie für die Diagnosestellung notwendig ist.

Somit soll die Dissertation einen Beitrag zu einer anwendbaren Diagnostik leisten und auch dem Tierschutz dienen. Denn wenn ein Blutaussstrich allein für die Diagnosefindung ausreichend ist, wäre das im Vergleich zur Biopsie sowohl für das Tier als auch für den Halter von Vorteil: eine Blutentnahme ist weniger invasiv, schneller in der Praxis durchführbar – u. U. auch zu Hause bei den Besitzern, ist kostengünstiger, das Ergebnis liegt zeitnah vor, das Narkoserisiko für eine Biopsieentnahme entfällt und damit auch die z. T. zeitaufwendige Nachsorge. Vielleicht wären dann auch mehr Schlangenhalter dazu bereit, ihre Tiere vorsorglich auf IBD untersuchen zu lassen. Mit den dadurch erhaltenen Daten könnte eine Aussage über das Ausmaß der Verbreitung von IBD in Deutschland getroffen werden und die Weiterverbreitung ließe sich besser eindämmen.

2 Literaturübersicht

2.1 Taxonomie der Schlangen

(Mattison 1999, Ahne et al. 2000)

Die **Klasse** *Reptilia* beinhaltet die **Ordnung** *Squamata* (Schuppenkriechtiere), die wiederum in die **Unterordnung** *Ophidia* (*Serpentes*) eingeteilt wird. Die Schlangen sind charakterisiert durch folgende Merkmale: ihr Körper ist lang gestreckt und sie besitzen keine Gliedmaßen; sie weisen eine „Brillenbildung“ auf (Verwachsung der Lider); sie haben kein äußeres Ohr oder Trommelfell und auch keine Harnblase. Momentan existieren 18 Familien, von denen 15 Familien in die **Überfamilie** *Alethinophidia* eingeordnet sind. Deren Charakteristika bestehen darin, dass sie meist keine Überreste des Beckengürtels aufweisen, mit Ausnahme mancher Boiden, welche Aftersporen besitzen. Zum Teil ist nur ihre linke Lunge entwickelt. Im Folgenden werden einige Familien mit einer Auswahl an Arten erwähnt, die für diese Arbeit von Bedeutung sind.

Der **Familie** *Boidae* (Riesenschlangen) werden momentan 25 Arten zugeteilt. Diese sind alle *vivipar* (lebend gebärend), besitzen Grubenorgane und ihre Nahrung besteht hauptsächlich aus Vögeln und Säugetieren, teilweise auch aus Echsen. Ihre jeweiligen Lebensräume sind sehr unterschiedlich und bestehen aus Wüsten, Wälder, Sümpfe bis hin zu tropischen Regenwälder. Ihre Verbreitung reicht von Amerika, über die Karibik, Südpazifik, Madagaskar bis Neuguinea. Sie sind Bewohner der Neuen Welt.

In der **Unterfamilie** *Boinae* sind folgende **Gattungen** vertreten:

- Boa → **Arten:** *Boa constrictor constrictor* = Abgottschlange oder Königsschlange
Boa constrictor occidentalis = Argentinische Boa constrictor
Boa constrictor imperator = Brasilianische Boa constrictor, Kaiserboa (Kolumbien)
Boa dumerili = Dumerils Boa (früher: *Acrantophis dumerili* = Südwestmadagaskarboa)

Boa madagascariensis = Madagaskar-Boa (früher:
Acrantophis madagascariensis = Erdboa)

- Candoia = Pazifikboa → **Arten:** Candoia carinata = Pazifikboa
- Corallus = Hundskopfboa → **Arten:** Corallus annulatus = Geringelte Hundskopfboa
Corallus caninus = Grüner Hundkopfschlinger
- Epicrates = Schlankboa → **Arten:** Epicrates cenchria = Regenbogenboa
Epicrates striatus = Haitiboa
- Eunectes = Anakonda → **Arten:** Eunectes murinus = Große Anakonda
Eunectes notaeus = Süd-/ Gelbe Anakonda

In der **Unterfamilie** *Erycinae* ist u. a. folgende **Gattung** vertreten:

- Charina = Zwergboa → **Arten:** Charina trivirgata = Dreistreifen-Rosenboa (früher:
Lichanura trivirgata)

Die **Familie** *Pythonidae* (Pythonschlangen) besteht aus 26 Arten. Historisch wurden sie der Familie *Boidae* zugeteilt. Heute bilden sie eine eigenständige Familie. Auch diese Schlangen besitzen Grubenorgane. Sie sind allerdings *ovipar* (Eier legend) und leben in den tropischen Gebieten der Alten Welt (Afrika, Australien, Asien, Indonesien). Ihre Nahrung besteht hauptsächlich aus Säugetieren, teils auch Reptilien und Vögel. Ihre Lebensräume sind Wüsten, Grasland, Wälder und Regenwälder. Folgende wichtige **Gattungen** seien hier erwähnt:

- Morelia = Rautenpython → **Arten:** Morelia boeleni = Boelens Rautenpython
Morelia spilota = Diamantpython
Morelia spilota variegata = Teppichpython
Morelia viridis = Grüner Baumpython (früher:
Chondropython viridis)
- Python → **Arten:** Python curtus = Blutpython oder Buntpython
Python molurus molurus = Tigerpython (hell)
Python molurus bivittatus = Dunkler Tigerpython
Python regius = Königspython
Python reticulatus = Netzpython
Python sebae = Felsenpython

Zur **Überfamilie** *Caenophidia* werden u. a. die **Familien** *Colubridae* (Echte Nattern) und *Viperidae* (Vipern) gezählt.

Die Nattern stellen mit 1858 Arten die artenreichste Gruppe dar. Sie besitzen weder einen Beckengürtel noch die linke Lunge. Dafür ist meist eine Tracheallunge gut entwickelt. Sie sind in fast allen Lebensräumen vertreten: Süßwasserseen, Berge, Höhlen, Wälder, Sümpfe bis hin zu den trockensten Wüsten und kommen auf nahezu allen Erdteilen vor. Ausnahme bildet Zentral- und Südaustralien, sowie kalte Gegenden. Ihre Nahrung besteht aus Wirbellosen, Säugetieren und z. T. Vögel und Echsen. Die meisten Colubriden sind *ovipar*. Zwei **Gattungen** sollen hier aufgeführt werden:

- Elaphe = Kettennattern → **Arten:** Elaphe carinata = Gekielte Kletternatter
Elaphe guttata = Kornnatter
Elaphe longissima = Äskulapnatter
Elaphe obsoleta = Kükennatter, Erdnatter
Elaphe quadrivittata/ quadrivirgata =
Japanische Vierstreifennatter
Elaphe quaturolineata = Vierstreifennatter
Elaphe obsoleta quadrivittata = Gelbe
Rattenschlange, Vierstreifenkükennatter
Elaphe radiata = Strahlennatter
- Lampropeltis = Königsnattern → **Arten:** Lampropeltis getulus = Gewöhnliche
Königsnatter
Lampropeltis getulus californiae =
Kalifornische Königsnatter
Lampropeltis zonata = Korallen-Königsnatter

Die Vertreter der **Familie** *Viperidae* sind gekennzeichnet durch ihren kurzen und stämmigen Körperbau und einen dreieckigen, breiten Kopf. Ihre Schuppen sind meist gekielt. Sie haben lange bewegliche Giftzähne und ein paar Grubenorgane. Sie stellen die höchstentwickelte Gruppe dar. Zu ihnen zählen ca. 228 Arten. Es findet eine nochmalige Unterteilung in zwei Unterfamilien statt:

Die **Unterfamilie** *Viperinae* = Echte Vipern leben hauptsächlich in Afrika, aber auch im Mittleren Osten, in Europa und Asien sind sie vertreten. Man findet sie in sämtlichen Lebensräumen: Berge, Wälder, Wiesen und Wüsten. Sie ernähren sich von Echsen, Insekten, Vögeln und Kleinsäugetern. Die hier aufgezählten **Gattungen** sind *vivipar*:

- Bitis = Puffottern → **Arten:** Bitis gabonica = Gabunviper
Bitis nasicornis = Nashornviper
- Vipera = Echte Vipern → **Arten:** Vipera russelli = Kettenviper
Vipera aspis = Aspiviper

Die Mitglieder der **Unterfamilie** *Crotalinae* = Grubenottern besitzen wärmeempfindliche Grubenorgane zwischen Augen und Nase. Sie sind Boden- oder Baumbewohner und in der Alten und Neuen Welt zu finden (Asien und Amerika). Es gibt sowohl *vivipare* als auch *ovipare* Vertreter. Ihre Nahrung besteht aus Amphibien, Echsen, Vögeln und Kleinsäugetern. Folgende **Gattungen** gehören dazu:

- Bothriechis = Palmenlanzenottern → **Arten:** Bothriechis marchi = Marchs
Palmenlanzenotter
- Bothrops = Amerikanische Lanzenottern → **Arten:** Bothrops jararaca = Jararaca
Lanzenotter
Bothrops jararacussu = Jararacussu
Grubenotter
Bothrops moojeni = Brasilianische
Lanzenotter
- Crotalus = Klapperschlangen → **Arten:** Crotalus horridus =
Waldklapperschlange
Crotalus unicolor = Aruba-
Klapperschlange
Crotalus cerastes = Gehörnte
Klapperschlange
Crotalus lepidus =
Felsenklapperschlange

2.2 Einschlusskörperchenkrankheit

(English: Inclusion body disease „IBD“)

2.2.1 Definition

IBD (Inclusion body disease), auch Einschlusskörperchenkrankheit genannt, kommt v. a. bei Schlangen der Familien *Boidae* und *Pythonidae* vor. Die Benennung beruht auf das spezifische Vorkommen charakteristischer intrazytoplasmatischer Einschlusskörper in histologischen Gewebeschnitten, die bei dieser Erkrankung auftreten. Diese Einschlüsse kommen in sämtlichen Epithelzellen vor, v. a. in denen viszeraler Organe und Neuronen, aber auch in Haut- und Schleimhautzellen (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001).

2.2.2 Geschichtliches

Seit Mitte der 1970er Jahre ist diese Krankheit bereits in den USA bekannt. Bis Ende der 1980er Jahre wurde IBD besonders bei Dunklen Tigerpythons (*Python molurus bivittatus*) diagnostiziert. Danach und bis heute wird die Erkrankung v. a. bei *Boa constrictor spp.* beobachtet (Schumacher et al. 1994, Jacobson 1997, Jacobson et al. 1999, Jacobson et al. 2001). Die Verlagerung der Krankheit von Pythons zu Boas kann evtl. damit erklärt werden, dass ab den 90er Jahren vermehrt Boas verkauft und gehalten wurden. Auch die Unbekümmertheit in der Zucht und im Handel mit diesen Tieren könnte zur Ausbreitung von IBD beigetragen haben (Jacobson 1997, Schumacher 2006, Keil 2009).

Heutzutage sollten alle Boiden sämtlicher Altersstufen als für IBD verdächtig angesehen werden. Über die genaue Verbreitung ist noch nichts Näheres bekannt. Fest steht, dass IBD weltweit vorkommt. Berichte über erkrankte Pythons aus Australien (Carlisle-Nowak et al. 1998), Boas aus Europa (den Kanarischen Inseln (Oros et al. 1998), der Tschechischen Republik (Knotek et al. 2007), Belgien (Vancraeynest et al. 2006)) und den USA (Jacobson et al. 2001) liegen vor.

Bei einer Wildfang *Boa constrictor constrictor* aus Surinam, die anorektisch und lethargisch war, diagnostizierte Schilliger et al. (2002) in der Sektion bzw. in der histologischen Untersuchung eine lymphoretikuläre Neoplasie mit Leukämie. Dabei konnten in den Magen-, Nieren- und Milzepithelzellen intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörper gefunden

werden. Dieser Bericht stellt den ersten myelomonozytären Leukämiefall mit einem Lymphom in Verbindung mit IBD virusähnlichen Einschlüssen dar.

Mittlerweile sind auch Berichte über IBD ähnliche Erkrankungen bei Nichtboiden wie Palmenlanzenottern (*Bothriechis marchi*) und Kornnattern (*Elaphe guttata*) (Raymond et al. 2001 und Fleming et al. 2003) veröffentlicht. Bei diesen Tieren traten vergleichbare klinische Symptome zu IBD auf, ebenso wie ähnliche eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlusskörperchen.

2.2.3 Ätiologie

Die Ätiologie dieser Erkrankung ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Als Ursache wird ein Retrovirus vermutet, das aber noch nicht genau eingeordnet werden kann (Schumacher et al. 1994). Beziehungsweise kann bis heute noch nicht genau sagen werden, ob das Retrovirus tatsächlich mit IBD in Verbindung steht, und ob es für diese Erkrankung auch wirklich verantwortlich ist (Schumacher et al. 1994, Wozniak et al. 2000, Jacobson 2007). Aufgrund der Morphologie und einer nachgewiesenen reversen Transkriptaseaktivität in virusinfizierten Zellen wird dies jedoch angenommen (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001). Wenn Retroviren für IBD verantwortlich sind, dann wäre das der erste Beweis einer systemischen retroviralen Erkrankung bei Reptilien, die nicht in Verbindung mit einer Neoplasie steht (Schumacher et al. 1994). Sporadisch wurde IBD auch bei *Colubriden* und *Viperiden* vermutet (Fleming et al. 2003, Raymond et al. 2001). Wobei die drei Kornnattern von Fleming et al. (2003) nach einer elektronenmikroskopischen Untersuchung andersartige Einschlüsse aufwiesen, worauf IBD als Befund nicht mehr in Betracht kam.

Es ist weiterhin unklar, ob IBD bei nicht boiden Schlangen dieselbe Ätiologie aufweist. Auch ist unbekannt, ob andere Reptilienarten Krankheitsträger sein könnten. Diese tragen das Virus u. U. in sich und zeigen dabei evtl. andere oder keine klinischen Symptome und bleiben somit unerkant (Schumacher 2006). Zusätzlich ist nichts bekannt über eine Verbreitung von IBD in der Wildtierpopulation. Weiterführend sind serologische Tests für Reihenuntersuchungen nötig, um herauszufinden, inwieweit Wildtiere betroffen sind und ob diese als Reservoir dienen (Schumacher et al. 1994). Auch Marschang (2004) konnte auf keinen Bericht verweisen, in dem über IBD in der Wildtierpopulation informiert wurde. Lock und Jacobson (2005) testeten frei lebende Kaiserboas (*Boa constrictor imperator*) auf einen Kontakt mit Retrovirusisolaten, die von IBD positiven Tieren stammten (Jacobson et al. 2001). Das Resultat fiel negativ aus.

Marschang et al. (2001) isolierten aus infizierten Schlangen Reo- und Adenoviren. Auch retrovirale Sequenzen wurden gefunden. Dabei ist unbekannt, ob und inwiefern diese mit IBD im Zusammenhang stehen. Es könnte sich dabei auch um fakultative Pathogene handeln, die, aufgrund der durch IBD verursachten Immunsuppression, ihr pathogenes Potential entfalten. Marschang et al. (2003) konnten aber auch neutralisierende Antikörper gegen ein Adenovirus bei Schlangen ohne IBD nachweisen.

2.2.4 Pathogenese

Der Übertragungsweg ist noch nicht genau erforscht. Es wird davon ausgegangen, dass sowohl direkter Kontakt der Tiere (Tröpfcheninfektion, aerogen) als auch indirekte Übertragung durch kontaminierte Gegenstände oder ungenügende Desinfektion beim Umgang mit den Tieren zur Ansteckung führen kann. Auch intrauterine Infektionen wurden beobachtet (Jacobson 2007). Außerdem wird vermutet, dass die Schlangemilbe, *Ophionyssus natricis*, u. U. als Vektor fungiert, da oft von einem vorangegangenen Befall bei Schlangen mit IBD berichtet wurde (Schumacher et al. 1994, Jacobson 1997, Jacobson et al. 2001, Keil 2009). Vermutlich sind auch asymptomatische Träger für die Verbreitung der Krankheit verantwortlich (Jacobson 1997). Auch Schumacher et al. (1994) äußerten die Vermutung, dass *Boa spp.* natürliche Wirte für den Erreger sein könnten, während *Python spp.*, z. B. Dunkle Tigerpythons (*Python molurus bivittatus*), Fehlwirte darstellen.

Die Inkubationszeit für IBD ist ebenfalls noch nicht genau bekannt. Blahak (2000) gab eine Inkubationszeit von bis zu eineinhalb Jahren an. Aufgrund der spärlichen Daten ist es schwierig, konkret zwischen akutem oder chronischem Verlauf zu unterscheiden. Und da noch keine serologischen Tests zur Verfügung stehen, ist das Ausmaß der Infektion nicht feststellbar (Jacobson 1999, Schumacher 2006).

Garner und Raymond (2004) führten *post mortem* Untersuchungen im Northwest Zoopath (Monroe, USA) durch. Ziel dieser retrospektiven Studie war es, mehr über die Prävalenz der Krankheit bei Boiden herauszufinden. Bei *Boa spp.* gab es innerhalb der Artengruppe Unterschiede in der Verteilung, wonach IBD bei z. B. *Corallus spp.* (*Corallus annulatus* = Geringelte Hundskopfboa, *Corallus caninus* = Grüner Hundskopfschlinger), Hybridboas und Kaiserboas (*Boa constrictor imperator*) häufig vertreten war, während z. B. bei Erdboas (*Acrantophis spp.*) und Regenbogenboas (*Epicrates cenchria*.) selten oder keine IBD Fälle gefunden wurden. Interessanterweise gab es keinen IBD Fall bei *Python spp.* oder Anakondas (*Eunectes spp.*). Laut Garner und Raymond (2004) wurden in weiteren Untersuchungen

teilweise andere morphologische Manifestationen bei Pythons mit IBD gesehen. Bei diesen standen Entzündungsgeschehen im Vordergrund, während Einschlüsse seltener vorhanden waren.

Allgemein scheint es laut Jacobson (1999), dass IBD heutzutage bei *Python spp.* seltener diagnostiziert wird. Vielleicht liegt es daran, dass sich die Virulenz des Virus geändert hat, Pythons eine Resistenz entwickelten, der Erreger mittlerweile andere klinische Erscheinungen (z. B. Atemwegserkrankungen) hervorruft oder es wird einfach nicht über positive Fälle berichtet. Jacobson (1999) und Jacobson et al. (2001) stimmten darin überein, dass Königspythons (*Python regius*) weniger empfänglich für IBD zu sein scheinen. Jacobson (1999) vermutete auch, dass Dreistreifen-Rosenboas (*Lichanura trivigata*) resistent gegenüber IBD sind, da über diese noch kein Bericht in der Literatur vorliegt.

Raymond et al. (2001) beschrieben bei Marchs Palmenlanzenottern (*Bothriechis marchi*) ein morphologisch identisches Bild, wie es bei IBD positiven Boas zu finden ist. Da aber Pythons mit Boas näher verwandt sind als mit Palmenlanzenottern, scheint es wiederum unwahrscheinlich, dass Pythons ein anderes Bild dieser Erkrankung zeigen sollten als Boas und Palmenlanzenottern (Garner und Raymond 2004). Garner und Raymond (2004) vertraten ebenfalls die Meinung, dass IBD bei Pythons seltener vorkommt und dass es andere Krankheitserreger (z. B. das Paramyxovirus) gibt, die mit IBD bei Pythons verwechselt werden könnten (West et al. 2001).

2.2.5 Klinik

Die klinischen Symptome stellen sich z. T. sehr variabel und unspezifisch dar. Es gibt kein pathognomonisches Symptom. Grundsätzlich sollten alle Boiden mit neurologischen Symptomen und chronischer Abmagerung als IBD verdächtig betrachtet werden (Schumacher 2006).

Eine der ersten und meist zitierten Arbeit über IBD stammt von Schumacher et al. (1994). Ihre Untersuchungen führten sie bei Schlangen aus privaten und zoologischen Beständen in den USA durch. Sie beschrieben folgende klinische Anzeichen, die sie v. a. bei betroffenen Boas beobachteten: Regurgitation, die später auch chronisch werden konnte, trat ca. 7-10 Tage nach der Nahrungsaufnahme auf. Danach folgten Lethargie, Anorexie, Gewichtsverlust und Dehydratation. Nach wenigen Wochen zeigten sich neurologische Störungen, die sich in Kopftremor, Opisthotonus, Tortikollis, Stargazing (Sterngucken), Desorientierung, Gleichgewichtsstörungen und progressiven Verlust motorischer Funktionen, v. a. der kaudalen

Körperhälfte, bis hin zu schlaffer Paralyse äußerten. Carlisle-Nowak et al. (1998) beschrieben zusätzlich noch das Vorkommen episodischer Krampfanfälle. Aufgrund dieser zentralnervösen Symptome zeigten sich auch Häutungprobleme (Dysecdysis), da die Tiere nicht mehr in der Lage waren, sich die alte Haut abzustreifen. Auch der Umkehrreflex konnte reduziert bis erloschen sein. Mitchell (2004) führte noch an, dass Pythons, aufgrund der stärker auftretenden neurologischen Störungen, nicht mehr in der Lage sind, Beute zu greifen bzw. Futter aufzunehmen. Folglich wird Regurgitation bei diesen Tieren kaum vorkommen. Oros et al. (1998) stellten bei ihren Boas außerdem noch Muskelschwäche fest, die es den Schlangen ebenfalls unmöglich machten, ihre Beute zu erwürgen.

Schumacher et al. (1994) fielen auch petechiale Blutungen in der Maulhöhle und auf den Bauchschuppen auf. Oft entwickelte sich eine Pneumonie, ggf. später mit Maulatmung. Ebenso waren Stomatitis und eine ulzerierende Maulschleimhaut zu beobachten. Jacobson et al. (2001), Jacobson (1997), Jacobson (2007) und Schumacher (2006) erwähnten außerdem noch das Vorkommen von undifferenzierten Hautsarkomen, Leukämie und lymphoproliferativen Störungen als untypische klinische Manifestationen. Solche atypischen Verlaufsformen traten im Vergleich zu früher, wie es von Schumacher et al. (1994) beschrieben wurden, vermehrt auf (Jacobson 1999). All diese Sekundärinfektionen können auf die Schwächung des Immunsystems zurückgeführt werden (Schumacher et al. 1994, Oros et al. 1998, Wozniak et al. 2000, Jacobson et al. 2001, Garner und Raymond 2004), evtl. hervorgerufen durch das Virus (Jacobson 1999). Anfänglich sind sie noch mit Erfolg behandelbar. Es treten aber stets Rezidive auf (Jacobson et al. 2001). Sekundärinfektionen sind bei Pythons eher weniger stark ausgeprägt. Bei ihnen kommen hauptsächlich nur zentralnervöse Störungen ohne Regurgitation vor. Der Krankheitsverlauf bei Pythons ist meist akut und endet vergleichsweise schnell mit dem Tod, im Gegensatz zu Boas, die asymptomatische Träger sein können. Bei Boas zieht sich IBD meist über Monate bis Jahre hin, endet aber stets tödlich (Schumacher et al. 1994, Blahak 2000, Jacobson et al. 2001). Im Endstadium treten v. a. die neurologischen Symptome in den Vordergrund.

Klingenberg (1999) nahm an, dass Schlangen meist erst im späteren Krankheitsstadium vorgestellt werden, da die Symptome oftmals wenig bis kaum ausgeprägt sind und nicht selten einfach übersehen werden. Er beschrieb in der chronischen Phase dieselben Symptome wie schon Schumacher et al. (1994): Anorexie, Lethargie, Gewichtsverlust, Dehydratation. Bei Boas kamen zusätzlich Sekundärinfektionen, wie Stomatitis, Pneumonie, nekrotische Dermatitis und Abszesse hinzu. Bei Pythons verlief die Krankheit schwerer und schneller, oft perakut, wobei neurologische Symptome im Vordergrund standen. Folglich kann es dabei zu

keiner Entwicklung von Sekundärinfektionen mehr kommen. Klingenberg (1999) vertrat die Meinung, dass Sekundärinfektionen bei geschwächten Boiden als Hauptsymptom genannt werden könnten. Er vermutete, dass verschiedene Virusstämme der Grund für die Symptomenvielfalt sind. Diese Möglichkeit zog auch Jacobson (2007) in Betracht. Außerdem fiel Klingenberg (1999) auf, dass IBD positive Pythons zu dieser Zeit keine zentralnervösen Störungen mehr zeigten.

Mader (1999) stellte fest, dass bei Jungtieren die Krankheit akut verlief, mit einer Mortalitätsrate von fast 100 %, während ältere Boas chronische Verläufe mit wiederkehrenden Sekundärinfektionen, v. a. im Atmungstrakt, aufwiesen. Dies beobachteten auch Schumacher et al. (1994) und Jacobson et al. (2001).

Marschang (2004) beschrieb allerdings weiterhin zentralnervöse Störungen und erwähnte als eines dieser Symptome noch zusätzlich eine auftretende Anisokorie, was auch Keil (2009) beobachtete und als Zeichen einer Enzephalitis deutete. Die Tatsache, dass bei Pythons IBD akut verläuft und neurologische Symptome im Frühstadium auftreten, scheint immer noch ihre Gültigkeit zu besitzen. Ebenso das Auftreten von chronischer Regurgitation bei Boas, bei denen erst im Spätstadium zentralnervöse Störungen auffallen. Vancraeynest et al. (2006) beobachteten in einigen Fällen noch nicht erwähnte Wirbelanomalien und/oder neoplastische Prozesse.

Knotek et al. (2007) führten eine Studie in der Tschechischen Republik durch, mit dem Ziel, Infektionsausbrüche mit mutmaßlich viraler Ätiologie bei Boas in Privatbeständen zu präsentieren. Dabei glichen die klinischen Symptome den vorher beschriebenen (z. B. intermittierende Regurgitation, schwacher Muskeltonus, neurologische Defizite). Vereinzelt kamen auch Durchfall, Milbeninfestation und Rhinitis/Stomatitis vor. Die Blutuntersuchung war relativ unauffällig, bis auf erniedrigte Hämatokrit- und Glucosewerte und erhöhte Harnsäure- und Phosphorwerte. Die Kotuntersuchung auf Protozoen und Wurmeier verlief negativ. Auch auf eine Paramyxovirusinfektion wurde getestet, wobei der Antikörpertiter bei einem Tier zu niedrig war, um als positiv interpretiert zu werden. Bei den anderen lag ein negatives Ergebnis vor. Anhand von klinischen Symptomen sind IBD und eine Paramyxovirusinfektion nicht unterscheidbar. Bei beiden Erkrankungen treten neurologische Störungen auf. Im Blutaussstrich fanden Knotek et al. (2007) keine Einschlüsse in Erythrozyten oder Lymphozyten. Dafür waren Einschlusskörper in Leber, Niere, Milz, Pankreas, Lunge, Darm, Magen und Herz vorhanden, wie es auch Schumacher et al. (1994) und Schumacher (2006) beschrieben. Da in allen Beständen eine Milbenmanifestation vorkam, wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass Milben als Vektoren für diese Erkrankung dienen, was auch

schon Schumacher et al. (1994) vermuteten. Laut Jacobson (2007) können einige Boas subklinisch infiziert sein, da klinisch gesund erscheinende Boas Einschlusskörper aufwiesen. Dabei besteht die Möglichkeit, dass latente Infektionen lange persistieren können. Schumacher (2006) vertritt ebenfalls die Meinung, dass Boas persistent infizierte Reservoirire darstellen, was dadurch bestätigt wurde, dass Pythons regelmäßig IBD entwickelten, nachdem sie Kontakt zu klinisch unauffälligen positiven Boas hatten.

Bisher wurde keine Remission bei IBD positiven Tieren beobachtet und alle betroffenen Tiere starben (Schumacher 2006).

2.2.6 Pathologie

In der Sektion fielen bei Schumacher et al. (1994) Milzatrophy und Milzfibrose auf. Auch das Pankreas war atrophisch und derb verändert. Beide Organe wiesen z. T. fokale Nekrosen auf, in denen teils gramnegative Bakterien nachgewiesen werden konnten. Die Leber zeigte ein blasses Erscheinungsbild und die Lunge enthielt weiße Knötchen, die ebenso auf der Nierenoberfläche zu Tage traten. Auch der Thymus war atrophisch und fibrotisch. Diese pathologischen Veränderungen waren v. a. bei *Boa spp.* ausgeprägt. Jacobson et al. (2001) beobachteten zusätzlich noch eine Depletion der Milzlymphozyten.

Makroskopisch waren die Tiere oft kachektisch und es lag eine Atrophie des Fettkörpers vor (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001, Vancraeynest et al. 2006).

In histologischen Gewebeschnitten zeigten sich unter dem Lichtmikroskop die charakteristischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörper in sämtlichen epithelialen Organen, einschließlich Gehirn- und Rückenmarksneuronen, die in der HE-Färbung eosinophil erschienen, während sie sich in der Giemsa-Färbung basophil anfärbten. Ebenso basophil stellten sich die Einschlüsse in der Methylenblaufärbung dar. In der PAS-Färbung zeigten sich die Einschlüsse laut Schumacher et al. (1994) allerdings negativ. Zu diesem histochemischen Ergebnis kamen auch Wozniak et al. (2000). Zusätzlich fanden die Autoren heraus, dass die Einschlusskörper PTAH (Phosphotungstic Acid Hematoxylin) positiv waren und orthochromatisch mit Toluidinblau. Daraus lässt sich schließen, dass das Material innerhalb der Einschlusskörper proteinhaltig ist. Wozniak et al. (2000) zeigten in ihrer Studie, dass sich die Einschlusskörperchen aus einem IBD virusassoziierten Protein mit 68 kD zusammensetzten. Die Einschlüsse stellten sich als nicht-viral in ihrem Aufbau dar. Eine negative Congorot-Färbung deutete darauf hin, dass das Material nicht amyloidähnlich war.

Die Größe der Einschlüsse variierte bei Schumacher et al. (1994) zwischen 1-4 µm, teilweise übertrafen sie sogar die Größe des Zellkerns. Die Autoren fanden bei allen untersuchten positiven Schlangen Einschlusskörper im Pankreas, während 70 % der Leber- und Nierenproben Einschlüsse enthielten und in 30 % der Fälle Einschlusskörperchen in der gastrointestinalen Schleimhaut vorkamen. Bei Boas konnten ebenfalls Einschlusskörperchen in der Schilddrüse, im Thymus und in Magenschleimhaut- und Lungenepithelzellen gefunden werden. Die Einschlüsse variierten auch in ihrer Anzahl. Es gab Fälle, in denen nur sehr wenige Einschlüsse vorhanden waren.

Teils kamen mononukleäre Lymphozyteninfiltrate in den Geweben vor. Zellen, welche die typischen Einschlüsse enthielten, zeigten eine Vakuolisierung und wiesen eine Degeneration der Zellen auf, v. a. in Leber- und Pankreaszellen (Vancraeynest et al. 2006). Die Zellkerne der Hepatozyten waren vergrößert, blass und vesikulär. Oft lag eine hepatische Lipidose vor (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001). In Leber und Nieren beobachteten Schumacher et al. (1994) bakterielle Granulome. Einige betroffene Organe zeigten auch Nekrosegebiete (Schumacher 2006).

Unterschiede gab es in den histologischen Schnitten des Nervengewebes. Während bei Boas mehr Einschlusskörperchen vorhanden waren, kamen bei Pythons vermehrt lymphoplasmazelluläre Entzündungsreaktionen vor. Bei beiden Arten konnte eine nichteitrige Meningoenzephalitis mit neuronaler Degeneration, Gliose, Demyelinisierung und perivaskuläre Manschettenbildung festgestellt werden, was auf eine virale Ätiologie hindeutet (Schumacher et al. 1994). Meningoenzephalitiden traten in Verbindung mit neurologischen Symptomen auf, v. a. bei Pythons, welche auch vermehrt Einschlusskörper im Zytoplasma der Neuronen aufwiesen, umgeben von mononukleären Zellinfiltraten (Schumacher 2006). In der weißen Substanz des Rückenmarkes trat ebenfalls eine Gliose mit hochgradiger Myelindegeneration und Axonschwund auf.

Jacobson et al. (2001) beobachteten bei mehreren Schlangen eine proliferative Pneumonie und/oder Enzephalitis mit lymphatischer perivaskulärer Manschettenbildung. Entzündungserscheinungen kamen eher selten vor. Lymphoide Infiltrate waren in multiplen Organen bei Schlangen mit lymphoproliferativen Störungen vorhanden.

Der Pathologe Homer (1999) und Jacobson (1999) stimmten überein, dass es schwierig ist, zwischen akuter und chronischer Infektion zu unterscheiden. Für die Chronizität dieser Krankheit sprechen folgende Befunde: Milz- und Pankreasatrophie und -fibrose, Verlust des Fettkörpers und der Muskulatur. Teils starben die Tiere auch anhand der Sekundärinfektionen.

Homer (1999) berichtete auch von Fällen, bei denen Flagellaten (Trichomonaden, Giardien) im Kot nachgewiesen oder Salmonellen aus Leber oder Milz isoliert wurden. Seit 1995 wurden in dessen Institut, bis auf eine Königspython und eine Kalifornische Königsnatter (*Lampropeltis zonata*), nur bei *Boa constrictors* diese Erkrankung diagnostiziert.

Unter dem Elektronenmikroskop fanden Schumacher et al. (1994) elektronendichte intrazytoplasmatische Einschlüsse im Pankreas, der Leber, Niere, im Gehirn und Rückenmark. Sie hatten keine umgebende Membran und einige Einschlüsse bestanden aus kleinen elektronendichten Untereinheiten, die polyribosomaler Abstammungen waren. Auch in der Peripherie der Einschlüsse lagen Untereinheiten, welche diese vergrößerten. Die Einschlussgröße variierte auch hier zwischen 1-4 µm und sie wiesen z. T. eine unterschiedliche Form auf. Im Elektronenmikroskop waren auch virale Partikel vorhanden, die einen Durchmesser von ca. 110 nm (80-120 nm) aufwiesen und morphologisch Retroviren des C-Typs ähnelten. Sie besaßen eine Hülle, welche vom Endoplasmatischen Retikulum stammte und hatten einen zentralen, elektronendichten Kern, der von einem hexagonalen Capsid umgeben war. Solche virusähnlichen Partikel kamen extrazellulär im Gehirn und im Zytoplasma von Neuronen, im Nierengewebe und auch im Pankreas vor. Ebenso waren sie in dilatierten Vakuolen des Endoplasmatischen Retikulums zu finden.

Für Jacobson (2000) bestanden die Einschlüsse im Elektronenmikroskop aus elektronendichten Untereinheiten, die evtl. eine Ansammlung von Ablagerungsmaterial in infizierten Zellen darstellen. Diese Vermutung äußerten auch Schumacher et al. (1994). Ebenso könnten die Einschlusskörperchen auch prävirales Material sein, oder sie repräsentieren einen zytopathogenen Effekt, der durch das Virus verursacht wird (Schumacher et al. 1994).

Auch Marschang (2004) berichtete von nicht membrangebundenen eosinophilen, intrazytoplasmatischen Einschlusskörpern, bestehend aus elektronendichtem Material. Allerdings konnten dort keine Virionen gefunden werden.

In der Studie von Wozniak et al. (2000) untersuchten die Autoren die Beziehung zwischen einer retroviralen Infektion und der Entwicklung nicht-viraler, intrazytoplasmatischer Einschlüsse bei Königsschlangen (*Boa constrictor constrictor*). Die Studiendauer betrug ein Jahr, in dem die Versuchstiere täglich untersucht und mehrere Leberbiopsien entnommen wurden. Boas, welche ein infektiöses Leberhomogenisat injiziert bekamen, entwickelten 10 Wochen *post infectionem* Einschlusskörper und IBD Viren konnten nachgewiesen werden. In der histologischen Untersuchung der ersten Leberbiopsie waren die Hepatozyten vakuolisiert und enthielten kleine Einschlusskörper. In den weiteren Biopsieproben nahm die Anzahl und Größe (bis zu 6 µm im Durchmesser) der Einschlüsse zu. Auch eine stärkere Vakuolisierung

der Hepatozyten war zu verzeichnen, was auch schon Schumacher et al. (1994) beobachteten. Elektronenmikroskopisch fanden die Autoren in den Leberproben C-typähnliche Retroviruspartikel. Diese nahmen ihren Ursprung von der Zytoplasmamembran. Die Partikel wiesen eine vergleichbare Morphologie auf wie sie bereits Schumacher et al. (1994) beschrieben hatten: behüllt, im Durchmesser 100-110 nm mit einem elektronendichten Kern, der von einem hexagonalen Capsid umgeben wurde. Spikeähnliche Peplomere waren auf der Membranhülle sichtbar. Demzufolge stimmten Größe, Morphologie und Knospungseigenschaften (von Zytoplasmamembranen) mit dem IBD Virus überein. Einschlusskörper < 2 µm bestanden ultrastrukturell aus intrazytoplasmatischen Aggregaten, welche aus granulärem, elektronendichten Material bestanden, die keinerlei Membranbegrenzung aufwiesen. Wozniak et al. (2000) vermuteten, dass das 68 kD Protein in dieser Form eine überproduzierte Komponente des Virus darstellte und sich im Zytoplasma der Wirtszelle ansammelte (vgl. Schumacher et al. 1994, Jacobson 2000). Größere Einschlüsse waren membrangebundene Aggregate, die sich aus granulärem, elektronendichten Material, vermischt mit filamentösen membranähnlichen Fragmenten, zusammensetzten. Diese größeren Einschlusskörper könnten phagolysosomalen Ursprungs sein und unvollständig abgebaute Substrate darstellen, wofür die Mischung sprechen würde.

Wozniak et al. (2000) merkten an, dass eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlüsse, die bei IBD der Boiden beobachtet wurden, bei keiner anderen Retrovirusinfektion vorkamen. Sie fanden auch heraus, dass sich die Einschlüsse, welche bei IBD vorkamen, aus einem 68 kD Protein zusammensetzten. Monoklonale Antikörper wurden gegen dieses Protein entwickelt. Diese markierten spezifisch die Einschlusskörper. Damit wurde gezeigt, dass IBD Einschlüsse eine intrazytoplasmatische Ansammlung eines IBD virusassoziierten Proteins darstellten und somit wahrscheinlich viralen Ursprungs sind. Das Material stammte aus der Leber einer IBD positiven Boa. Keines der Tiere, ob positiv oder negativ, entwickelte sichtbare klinische Symptome von IBD. Dies spräche vielleicht dafür, dass unterschiedliche Virusstämme existieren, es eine Wirtsanpassung gab, oder dass noch andere unidentifizierte Faktoren eine Rolle spielen. Retrovirusähnliche Partikel waren im Elektronenmikroskop sichtbar, lagen aber nicht zusammen in Zellen mit Einschlusskörpern. Dies könnte evtl. ein Hinweis darauf sein, dass Einschlüsse über die Virusreplikation hinaus in den Zellen bestehen bleiben oder es lag einfach nur an der Schnittführung. Die Schlangen der Kontrollgruppe entwickelten keine Einschlusskörper und Viren wurden ebenfalls nicht nachgewiesen. Auch die 68 kD Proteinbande war nicht vorhanden.

Garner und Raymond (2004) vertraten die Meinung, basierend auf verfügbaren Informationen, dass IBD eine Infektionskrankheit ist, die sich morphologisch als Fehler im Zellstoffwechsel manifestiert und mit der Anhäufung eines Proteinnebenproduktes einhergeht. IBD Einschlüsse ähnelten solchen Nebenproduktansammlungen. Typischerweise sind die Zellen dabei nicht degeneriert. Der Zustand bewirkt keine Entzündungsreaktion und es existieren keine überzeugenden morphologischen Beweise, dass die Einschlüsse infektiöse Partikel enthalten.

Schumacher et al. (1994) wiesen im Plasma positiver Tiere die reverse Transkriptase nach, welche für das Vorhandensein von Retroviren spricht. Auch untersuchten sie primäre Nierenzellkulturen, die von positiven Boas stammten. Darin waren eine Vakuolisierung des Zytoplasmas und die Bildung eines Synzytialzellverbandes zu beobachten. Ebenso konnten kleine elektronendichte, granuläre Einschlusskörper gefunden werden, die z. T. virale Partikel enthielten. Solche viralen Partikel kamen auch im Zytoplasma in dilatierten Vakuolen vor. Sie hatten einen Durchmesser von 90-110 nm und auf ihrer Hüllmembran befanden sich kleine Projektionen.

Um die Kochs Postulate zu erfüllen, führten Schumacher et al. (1994) einen Übertragungsversuch bei 2 Dunklen Tigerpythons (*Python molurus bivittatus*) durch, in dem ein viruspositiver Gewebezellüberstand diesen Schlangen injiziert wurde. Danach entwickelte sich innerhalb von acht Tagen bei beiden Schlangen eine Anorexie. Dann kam es zu einem progressiven Verlust der motorischen Funktion. Und schließlich zeigten sich neurologische Symptome in Form von Koordinationsstörungen, Desorientierung und Verlust des Umkehrreflexes. Eine Python starb nach sechs Wochen, die andere wurde aufgrund der schweren neurologischen Störungen euthanasiert. Anschließend wurden histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Histologisch fanden die Autoren eine nichteitrige Enzephalitis (v. a. Lymphozyten), degenerierte Neuronen mit vakuolisiertem Zytoplasma und Einschlüsse im Gehirn. Außerdem waren die Hepatozyten und die pankreatischen Acinzellen vakuolisiert. Elektronenmikroskopisch sahen die Autoren im Gehirn und im Pankreas eine moderate Anzahl an elektronendichten Einschlusskörperchen, bestehend aus fein granuliertem Material. Virale Partikel konnten allerdings nicht gefunden werden. Und eine Virusisolation aus den primären Nierenzellkulturen war nicht möglich.

Auch Wozniak et al. (2000) berichteten von Übertragungsversuchen, bei denen IBD bei Boas hervorgerufen werden konnte. Dabei wurden Einschlusskörperchen und Viruspartikel gefunden, aber es entwickelten sich keine klinischen Symptome.

Im Gegensatz dazu, konnten mehrere Retroviren aus Boiden isoliert werden, die aber kein IBD durch eine experimentelle Infektion bei Boas auslösten (Carlisle-Nowak et al. 1998, Huder et al. 2002).

Jacobson (1997) erwähnte in seinem Update über IBD, dass in dessen Labor ein Virus von einer IBD positiven *Boa constrictor* isoliert und elektronenmikroskopisch untersucht wurde. Zusammen mit einer gemessenen reversen Transkriptaseaktivität wurde die These unterstützt, dass das Virus zur Familie der *Retroviridae* gehören könnte.

Eine Australische Teppichpython (*Morelia spilota variegata*) und eine Australische Rautenpython (*Morelia spilota spilota*) wurden von Carlisle-Nowak et al. (1998) untersucht. Dabei zeigten sich auffällige zentralnervöse Störungen. Die Teppichpython bekam eine Therapie mit Antibiotika und Anthelmintika, worauf das Tier aber nicht ansprach und euthanasiert wurde. Histologisch fanden die Autoren bei beiden Tieren 2-10 µm große intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörperchen, v. a. in Hepatozyten und renalen Tubulusepithelzellen. Bei der Teppichpython untersuchten die Autoren noch das Gehirn, das ebenfalls Einschlüsse enthielt und degenerative Veränderungen aufwies. Aufgrund weiterer Veränderungen, wie z. B. die Vakuolisierung der Hepatozyten und eine lymphoiden Depletion der Milz, kam bei beiden Schlangen die Vermutung einer viralen Infektion auf. Bei der Sektion der Rautenpython fiel in der Coelomhöhle ein Aszites auf (200 ml strohfarbene wässrige Flüssigkeit), der evtl. sekundär aufgrund portaler Hypertension, bedingt durch eine Lebererkrankung, Hypoproteinämie oder durch vaskuläre Schäden, verursacht wurde. Da sowohl die klinischen Symptome als auch die histopathologischen Befunde der Pythons mit IBD übereinstimmten (Schumacher et al. 1994, Schumacher 2006), wurde diese Diagnose gestellt. Dies ist der erste veröffentlichte Bericht über IBD bei Pythons in Australien.

Oros et al. (1998) berichteten in ihrem Artikel von den klinisch pathologischen Befunden bei einer Solomon Island Erdboa (*Candoia carinata*) und einer *Boa constrictor* (*Boa constrictor constrictor*) aus jeweils verschiedenen privaten Beständen. Dies ist der erste dokumentierte Fall in Spanien und gleichzeitig der erste IBD Fall bei einer Erdboa, die ein Jahr zusammen mit einer Dunklen Tigerpython (*Python molurus bivittatus*) ohne klinische Symptome gehalten wurde. Beide Tiere zeigten im Endstadium zentralnervöse Störungen. Nur die *Boa constrictor* regurgitierte intermittierend. Histopathologisch waren Sekundärinfektionen in Form von Stomatitis und Pneumonie vorhanden. Ansonsten gab es nur milde Entzündungsreaktionen in Leber, Lunge und Magen; keine im Gehirn. Einschlusskörper fielen in Leber, Pankreas und Nervengewebe auf. In Verbindung mit den Einschlüssen kamen keine Entzündungszellen vor, wie auch von Schumacher et al. (1994) und Carlisle-Nowak et al.

(1998) berichtet wurden. Als gemeinsam auftretende Zellveränderungen waren eine ballonartige Degeneration und Vakuolisierung in Pankreas und Leber sichtbar. Bei der Erdboa fanden die Autoren noch kalzifizierte Granulome in der Dünndarmschleimhaut, eine geringgradige Tubulusnekrose und eine geringgradige Depletion der Milz. Elektronenmikroskopisch kamen im Pankreas elektronendichte, intrazytoplasmatische Einschlüsse, ohne umgebende Membran (wie auch von Schumacher et al. 1994 erwähnt wurden), vor, teils umgeben von einem Ring schmaler elektronendichter Partikel. Unreife Viruspartikel traten in Verbindung mit Einschlüssen im Zytoplasma auf und hatten einen Durchmesser von 85-105 nm. Zusätzlich befanden sich virale Partikel in erweiterten Vakuolen des Endoplasmatischen Retikulums und frei im Zytoplasma. In der Leber der Boa constrictor waren nur gelegentlich virale Partikel in Zellen mit Einschusskörpern vorhanden.

Die 2001 von Raymond et al. untersuchten acht Marchs Palmenlanzenottern (*Bothriechis marchi*) zeigten relativ unspezifische klinische Symptome (Anorexie, Regurgitation, Parese, Dehydratation), vergleichbar mit denen von Schumacher et al. (1994) beschriebenen Symptomen bei Boa constrictors, oder waren klinisch unauffällig. Bei einer Marchs Palmenlanzenotter fiel der Verlust der motorischen Funktion der kaudalen Körperhälfte auf, wie es auch bei IBD positiven Pythons vorkam (Schumacher et al. 1994). Histologische Veränderungen zeigten sich v. a. in den Nieren und der Leber. Die Autoren stellten Uratnephrose, hepatozelluläre Degeneration und eine Degeneration der renalen Tubulusepithelzellen fest, ebenso waren Granulome und septische Thromben in einigen Organen vorhanden. Auch fanden die Autoren eine biliäre Hyperplasie, Hepatitis, Gastroenteritis, Aortenmineralisation, interstitielle Pneumonie und hepatische Melanose. In den histologisch angefärbten Schnitten sämtlicher Organe kamen intrazytoplasmatische, runde bis ovale, eosinophile Einschlusskörper (1-5 µm) vor, wobei Leber und Niere immer betroffen waren. Bei einigen Tieren wurden Einschlüsse im Respirations- und Gallengangsepithel, in Magen- und Darmschleimhaut, in quergestreiften Muskelfasern und in Schilddrüsenfollikelzellen gefunden. Einige positive Gewebe wurden unterschiedlich angefärbt. Dabei kam heraus, dass sich die Einschlüsse positiv anfärben ließen in der HE-, Giemsa- und Toluidinblau-Färbung, wohingegen sie PAS negativ waren. Elektronenmikroskopisch stellten sich die intrazytoplasmatischen, unterschiedlich großen Einschlusskörper als nicht membrangebunden dar. Sie bestanden aus elektronendichten, globulären oder laminären Material. Darin befanden sich z. T. 59-69 nm große, behüllte, elektronendichte, virusähnliche Partikel, deren morphologische Merkmale denen der Familie *Retroviridae* glichen. Diese Ergebnisse entsprachen den Befunden bereits beschriebener IBD positiver Boiden (Schumacher et al. 1994, Schumacher

2006, Carlisle-Nowak et al. 1998, Oros et al. 1998). Aufgrund der Ähnlichkeiten dieser beiden Erkrankungen bei Palmenlanzenottern und Boiden, könnte schlussfolgernd gesagt werden, dass beide durch denselben Erreger verursacht wurden. Wahrscheinlich fand die Übertragung sowohl horizontal zwischen den Elterntieren bzw. in den jeweiligen Unterbringungen, als auch vertikal statt und ging vermutlich von asymptomatischen IBD Trägern aus.

Ein Bericht über die ersten dokumentierten Fälle von IBD bei zwei Abgottschlangen (*Boa constrictor constrictor*) und einer Argentinischen Boa (*Boa constrictor occidentalis*) in Belgien stammten von Vancraeynest et al. (2006). Während die beiden Abgottschlangen regurgitierten, war bei der Argentinischen Boa ein Milbenbefall zu verzeichnen. Alle drei Boas zeigten Inappetenz und geringgradig zentralnervöse Symptome. Bei einer Leberbiopsie bzw. bei der Sektion fanden die Autoren in der Leber und im Pankreas viele Einschlusskörper, die einen Durchmesser von bis zu 20 µm aufwiesen. Proben von Pankreas, Niere und Leber aus der Sektion wurden im TEM untersucht und darin elektronendichte Einschlüsse gefunden. In und um einige der Einschlüsse kamen sphärische Partikel mit einem Durchmesser von ca. 90 nm vor. Diese Partikel zeigten keinerlei spezifisch morphologische Merkmale für Retroviren und es konnten keine retroviralen C-Typ Virionen gefunden werden.

2.2.7 Diagnose

Zur Diagnosestellung werden sowohl Gewebeschnitte als auch Blutausstriche herangezogen. Das Blutbild infizierter Schlangen ist meist unspezifisch verändert. Auffällig ist häufig nur die hohe Anzahl an Leukozyten ($> 30.000/\mu\text{l}$), die im Frühstadium auftritt (Jacobson 1999, Schumacher 2006, Jacobson 2007). Einige Schlangen wiesen sogar > 100.000 Leukozyten/ μl auf, wobei Lymphozyten die vorherrschende Zellfraktion darstellte (Jacobson 2000, Jacobson 2007).

Schumacher et al. (1994) untersuchten das Blut von akut und chronisch infizierten Schlangen. Dabei kam heraus, dass im akuten Stadium eine Leukozytose mit relativer Lymphozytose vorhanden war. Schumacher (2006) erwähnte noch die Tatsache, dass im fortgeschrittenen Stadium von IBD eine Leukopenie (WBC < 5.000 Zellen/ μl) auftritt. Diese Auffälligkeiten erwähnte auch Jacobson (1999). Außerdem waren das Gesamtprotein und der Globulinwert erniedrigt. Die GOT-Werte waren signifikant höher als bei chronisch infizierten Tieren.

In Blutausstrichen konnten die typischen Einschlüsse im Erythrozytenzytoplasma gefunden werden. Jacobson et al. (2001), Jacobson (2007) und Schumacher (2006) berichteten aber

auch von Einschlüssen v. a. in peripheren Lymphozyten; seltener in Thrombozyten und Granulozyten. Die viralen Einschlüsse heben sich deutlich vom Zytoplasma der Lymphozyten ab, füllen das Zytoplasma fast vollständig aus und drücken teilweise den Zellkern halbmondförmig ein. Mader (1999) beobachtete Leukozyten mit toxischen Veränderungen.

Nach Keils (2009) Aussage, zeigen nur Blutausrich von Boas die Einschlüsse in Erythrozyten. Bei Pythoniden dagegen kommen diese nicht in Erythrozyten vor. Allerdings kann es sein, dass nur ein befallener Erythrozyt auf Tausend Erythrozyten auffällt. Deshalb sollten verdächtige, aber negativ diagnostizierte Tiere unbedingt nochmals nach einigen Monaten untersucht werden.

Klingenberg (1999) berichtete von himmelblauen Einschlüssen, sowohl in Erythrozyten als auch in Lymphozyten. Als Färbungen setzte er DiffQuik und Giemsa ein. Es ist allerdings noch nicht bewiesen, ob die Einschlüsse eine direkte Beziehung zum Virus haben. Werden Einschlüsse im Blutausrich gefunden, sollte zur Verifizierung auch eine Leberbiopsie durchgeführt und auf Einschlusskörper hin untersucht werden. Wenn keine Einschlusskörper gefunden werden, können zusätzlich Gewebeproben von Magen, oesophagealen Tonsillen oder den Nieren entnommen werden (Klingenberg 1999).

Mitchell (2004) erwähnte als diagnostisches Mittel für IBD ebenfalls das Auffinden von Einschlüssen in Erythrozyten. Dabei gab er aber zu bedenken, dass nicht-virale Einschlüsse in roten Blutzellen keine Seltenheit bei Reptilien sind. Bei der Diagnosestellung durch Biopsien, verweist er auf deren geringe Sensitivität, und dass dadurch falsch-negative Ergebnisse möglich sind.

Jacobson (1999) wiederum empfiehlt zur Diagnosestellung am lebenden Tier eine Biopsieentnahme von Leber, Magen oder oesophagealen Tonsillen mittels eines flexiblen Endoskops. Dabei sind die Einschlüsse in der HE-Färbung leichter zu erkennen als in der Wright-Giemsa-Färbung.

Oft wird die Diagnose erst *post mortem* anhand der charakteristischen intrazytoplasmatischen, eosinophilen Einschlüsse in den Gewebeschnitten gestellt, wobei die Anzahl der Einschlüsse von Fall zu Fall variieren kann (Schumacher et al. 1994). Dies beschrieben auch Jacobson et al. (2001) in ihren Bericht. Bei einigen Schlangen konnten nur wenige Einschlüsse entdeckt werden, während bei anderen diese in sämtlichen Organen gefunden wurden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Diagnose von IBD gestellt werden kann, sobald Einschlusskörperchen vorhanden sind. Was allerdings andersherum nicht heißt, dass, wenn keine Einschlüsse auffindbar sind, dieses Tier als frei von IBD bezeichnet werden kann. Diese Meinung vertraten auch Schumacher et al. (1994).

Laut Schumacher (2006) kann IBD u. U. bei Pythons eher übersehen werden, da häufig, im Vergleich zu Boas, kaum Einschlusskörper auftreten.

In ihrem Artikel beschrieben Garner und Raymond (2004) verschiedene Techniken, um IBD diagnostizieren zu können. Sie sind der Meinung, dass die Keilbiopsie der Leber die beste Methode zur IBD Diagnosestellung ist. Zwar können sämtliche Organe von IBD betroffen sein, am häufigsten sind jedoch die Einschlusskörper in Leber, Pankreas, Niere und Magen zu finden. Dies wird auch von verschiedenen anderen Autoren bestätigt (Schumacher et al. 1994, Jacobson 1999, Jacobson et al. 2001). Vor allem die ultraschallgeführte perkutane Leberbiopsie eignet sich sehr gut, um Probenmaterial zu gewinnen (Isaza et al. 1993). Raymond und Garner (2004) hielten die endoskopische Magenbiopsie zwar auch für sensitiv, sie setzt aber eine spezielle Ausrüstung voraus. Die Durchführung kann zudem bei zu kleinen oder zu großen Tieren evtl. problematisch sein. Eine Pankreas- und Nierenbiopsie ist im Allgemeinen zu invasiv. Hautbiopsien sind im Vergleich zu Leberbiopsien nicht so aussagekräftig. Wie sich herausstellte, kann die Sensitivität jedoch gesteigert werden, indem mehr als eine Hautbiopsie entnommen wird. Garner und Raymond (2004) nahmen auch eine zytologische Untersuchung vor. Dafür wurden Buffy Coat Ausstriche von IBD positiven Geringelten Hundskopfboas (*Corallus annulatus*) gefärbt. Dies stellte sich aber als nicht ideal zur Diagnosefindung heraus, da sich die zytoplasmatischen Einschlüsse in der routinemäßigen Romanowsky-Färbung nicht gut anfärben ließen und somit leicht übersehen werden. Auch Verwechslungen mit Zelltrümmern, infektiösen Erregern oder phagozytiertem Fremdmaterial können vorkommen. In HE-Färbungen sind die Einschlüsse typisch angefärbt. Die Anfertigung und Beurteilung erfordert aber ein histologisches Labor für die gesamte Durchführung. Da die Leber typischerweise eine hohe Dichte an Einschlusskörpern besitzt, versuchten Garner und Raymond (2004) die Leberaspirationszytologie. Die Technik erwies sich aber als wenig sensitiv zur IBD Diagnostik, da die Hepatozyten instabiler erschienen als z. B. die von Vögeln oder Säugetieren, und somit kaum intakte Zellen zur Beurteilung gewonnen werden konnten. Auch Untersuchungen von Magenlavageproben wurden versucht, sind aber kaum zur IBD Diagnostik geeignet, da extrem wenig Zellen mit Einschlüssen vorkamen und auch die Probenbearbeitung sehr aufwendig ist .

Histologisch kann auch das Fehlen einer Gewebe- oder Zellreaktion hilfreich sein, um andere einschlussformende virale Störungen auszuschließen (Vancraeynest et al. 2006).

Das Wissen über virale Krankheiten bei Reptilien war bis vor einigen Jahren noch relativ gering. Heutzutage wird in diesem Bereich mehr geforscht. Erstens ist der Bedarf größer, da es inzwischen immer mehr Reptilienhalter gibt, und zweitens sind bessere und ausgereifere

Diagnostiktechniken für den Nachweis von Viren vorhanden, z. B. ELISA, PCR, bessere Virusisolierung (Jacobson 2000, Jacobson et al. 2001, Levine 2002, Lock et al. 2003, Lock und Jacobson 2005).

Nach wie vor sind serologische und molekulare Tests nötig, um bei Übertragungsstudien sicherstellen zu können, dass die Versuchstiere Virus-negativ sind, damit eine ursächliche Beziehung festgestellt werden kann. Deshalb wurde ein ELISA entwickelt, um Boas allgemein auf Kontakt mit spezifischen Antigenen hin zu überprüfen (Lock et al. 2003). Lock und Jacobson (2005) testeten mit Hilfe dieses ELISAs wildlebende Brasilianische Kaiserboas (*Boa constrictor imperator*) auf das Vorkommen von Retrovirusisolaten, die aus IBD positiven Boas von Jacobson et al. (2001) isoliert wurden. Es konnte aber kein Kontakt nachgewiesen werden.

Chang et al. (2009) entwickelten polyklonale Antikörper gegen Einschlusskörper in Gewebeschnitten und gegen ein IBD spezifisches Protein in den Einschlüssen. An der Sequenzierung des IBD Proteins und des Retrovirus wird gearbeitet. Sobald diese bekannt sind, kann festgestellt werden, ob ein ätiologischer Zusammenhang besteht.

Die Tatsache, dass bei Boas endogene Retroviren vorkommen (Huder et al. 2002), erschwert die ätiologische Diagnosefindung zusätzlich. Auch Adeno- und Reoviren konnten aus Schlangen isoliert werden, die neurologische Erkrankungen aufwiesen (Marschang et al. 2001). Deshalb ist es schwierig festzustellen, ob diese Viren nicht auch eine Rolle bei IBD spielen könnten.

2.2.8 Differentialdiagnose

Die Liste der Differentialdiagnosen ist relativ umfangreich und erschwert zusätzlich die Diagnose von IBD zu stellen.

Für Regurgitation bestehen folgende Möglichkeiten (Vancraeynest et al. 2006):

Stomatitis, suboptimale Haltungstemperatur, Intoxikation (Milbenbekämpfungsmittel Organophosphat oder Metronidazol), Septikämie, Neoplasie, Fremdkörper, parasitäre Infektionen (Amöbiasis, Trichomoniasis, Kokzidiose, Cryptosporidiose, Wurmeier), grobes Handling nach Fütterung, Trauma.

Bei ZNS-Störungen kommen folgende Erkrankungen in Betracht (Vancraeynest et al. 2006): Bakterielle, virale (z. B. Paramyxovirus (PMV): West et al. 2001), mykotische oder parasitäre Infektion, Protozoen (*Acanthamoeba*, *Entamoeba invadens* -> Gehirnabszess bei Schlangen), Intoxikation (Organophosphat), bakterielle Septikämie, Überhitzung.

West et al. (2001) berichteten von einer Boelens Rautenpython (*Morelia boeleni*), die akut neurologische Störungen aufwies. Bei der histopathologischen Untersuchung fanden die Autoren eine nichteitrige Meningoenzephalitis und gelegentlich eosinophile, intrazytoplasmatische Einschlusskörper in Gliazellen. Aufgrund dessen bestand der Verdacht auf IBD (Schumacher et al. 1994), was allerdings nicht bestätigt werden konnte, da in sämtlichen anderen Organen keine Einschlüsse vorgefunden wurden. Dafür konnten die Autoren mittels einer *in situ* Hybridisierung mit cDNA Proben Paramyxoviren nachweisen, die ebenfalls für zentralnervöse Symptome verantwortlich sind. Deshalb muss PMV bei neurologischen Erkrankungen auch bei Pythons auf die Differentialdiagnoseliste. Bisher wurde PMV v. a. bei Schlangen der Familie *Viperidae* festgestellt. Einen der ersten Berichte über diese Erkrankung stammte von Fölsch und Leloup (1976). Darin beschrieben sie den Verlauf dieser Infektion in einem Vipernbestand.

Zur Diagnosefindung von IBD sollten die Differentialdiagnosen ausgeschlossen werden (Schumacher 2006). Dabei ist ein gründlicher Vorbericht von essenzieller Bedeutung.

2.2.9 Therapie

Eine Therapie ist nicht verfügbar. Mögliche unterstützende Maßnahmen beschränken sich bisher auf Zwangsfütterung, Infusionen, bei Sekundärinfektionen Antibiotika und lokale Behandlungen. Der Krankheitsverlauf wird damit aber nicht verändert (Schumacher 2006). Jacobson et al. (2001) und Jacobson (2007) raten aufgrund dessen zur Euthanasie der Tiere. Unter Umständen kann Diazepam eingesetzt werden, um die Anfallsrate zu senken (Ritchie 2006).

Wenn es sich um eine einzeln gehaltene Schlange handelt, die noch ein gutes Allgemeinbefinden aufweist, kann diese so lange in Besitz bleiben wie es ihr Zustand zulässt. Beim Auftreten erster Symptome sollte allerdings die Euthanasie in Erwägung gezogen werden. Betroffene Tiere dürfen auf keinen Fall weiter verkauft oder in andere Bestände gebracht werden (Schumacher et al. 1994, Schumacher 2006, Jacobson 2007). Das wichtigste Ziel bei

Therapieversuchen sollte sein, Ausbrüche in boiden Beständen zu limitieren bzw. möglichst zu verhindern (Schumacher 2006).

Tritt in einem Bestand IBD auf, darf kein Zu- und Verkauf mehr stattfinden. Verdächtige Tiere sollten sofort isoliert werden. Bei bestätigter Diagnose wird die Euthanasie empfohlen. Terrarien infizierter Tiere müssen vor dem nächsten Gebrauch gut gereinigt und desinfiziert werden (Jacobson 1999). Besonderes Augenmerk sollte auch auf die Hygienemaßnahmen und Schädlingsbekämpfung gerichtet werden (Klingenberg 1999).

Wenn Schlangen klinische Symptome, aber einen negativen histopathologischen Befund aufweisen, empfiehlt Jacobson (1999) die isolierte Haltung. Einige Schlangen (v. a. bei Pythons) haben nur wenige Einschlusskörper, die evtl. nicht gefunden werden (Schumacher 2006).

Klingenberg (1999) empfiehlt nach der Quarantänezeit eine wiederholte Biopsieentnahme, da sich u. U. auch erst später Einschlüsse entwickeln können. Auch die Verteilung der Einschlusskörper kann in den verschiedenen Organen unterschiedlich sein.

Levine (2002) führte einen Therapieversuch bei einer Kolumbianischen Boa constrictor (*Boa constrictor imperator*) durch, in dem er dem Tier Nukleosid-Reverse-Transkriptase-Hemmer (NRTI) verabreichte. Die Boa zeigte unspezifische Symptome wie Regurgitation, Anorexie, eine Leukozytose mit Lymphozytose und toxische Heterophile. Bei der folgenden Coeliotomie wurde jeweils eine Biopsie von Leber, Niere und Magen entnommen. Histologisch konnten intrazytoplasmatische, acidophile Einschlüsse gefunden werden, die für IBD sprachen. Nach der Diagnosestellung verabreichte der Autor Trizivir, eine Mischung aus Abacivir, Zidovudine und Lomivuridine, für acht Wochen. Diese antiviralen Medikamente stören die Translation von viraler RNA in DNA. Somit wird eine Ausbreitung der Retroviren aus infizierten Zellen beeinträchtigt. Zwei Wochen nach Therapiebeginn trat eine vorübergehende Verbesserung des Allgemeinbefindens ein und die Leukozytenzahl lag wieder im Normbereich. Allerdings starb das Tier nach achtwöchiger Therapiezeit. Dieser erste Einsatz von Anti-HIV Therapeutika könnte u. U. einen Nutzen in der IBD Behandlung bringen.

2.2.10 Prophylaxe

Der Verhinderung der Einschleppung in bestehende Bestände kommt eine besondere Bedeutung zu, da IBD nicht heilbar ist (Schumacher 2006). Jacobson et al. (2001) und Jacobson (2007) raten bei neuen Tieren, bevor sie in den Bestand aufgenommen werden, eine

Quarantänezeit von mindestens 90 Tagen. Bei *Boa spp.* allerdings ist mindestens eine sechsmonatige Quarantäne zu empfehlen, da diese, wie vorher schon erwähnt, asymptomatische Träger sein können. Besonders chronisch infizierte Boas zeigen im Frühstadium nur unspezifische oder keinerlei klinische Symptome (Schumacher 2006). Dies birgt v. a. die Gefahr der Einschleppung. Die Quarantänräume sollten separat liegen und über ein eigenes Luftsystem verfügen (Jacobson 1999, Schumacher 2006). Außerdem ist eine Milbenmanifestationen zu vermeiden. Beim Auftreten dieser Ektoparasiten sind sofortige Bekämpfungsmaßnahmen einzuleiten. Schumacher (2006) berichtete über Bestände, die IBD positive Tiere hatten und bei denen vorberichtlich auch stets Milbenbefall als Problem erwähnt wurde. Hygienemaßnahmen sind ebenfalls von Bedeutung (Schumacher 2006).

Hölzerne Terrarien, in denen infizierte Schlangen lebten, sowie Einrichtungsgegenstände aus Holz oder schwer zu säubernde Materialien sollten komplett entsorgt werden. Terrarien aus Fiberglas müssen gut gesäubert, mit Chlor oder Natriumhypochlorid desinfiziert und an der Sonne getrocknet werden, bevor sie neu besetzt werden können (Jacobson et al. 2001).

Mader (1999) und Schumacher (2006) empfehlen zusätzlich am Anfang und am Ende der Quarantäne eine Blut- und Kotuntersuchung durchzuführen.

Die jeweiligen Schlangenarten, ob boid oder nichtboid, sollten grundsätzlich getrennt voneinander gehalten werden, da nicht sicher ist, welche Arten latent infizierte Träger sein können (Schumacher 2006). Alle Schlangen, die gestorben sind, sollten außerdem aus Sicherheitsgründen einer Sektion unterzogen werden.

Als Vorsichtsmaßnahme sind Tiere nur aus zuverlässigen und seriösen Zuchten zu erwerben, bei denen die Züchter freiwillig Untersuchungen auf IBD durchführen lassen, und auch darauf achten, dass ihre Elterntiere möglichst nicht infiziert sind (Keil 2009).

2.3 Viren

2.3.1 Viren allgemein

Der lateinische Begriff „Virus“ heißt übersetzt „Gift“. Viren sind obligat zellgebundene Krankheitserreger und vermehren sich ausschließlich intrazellulär. Sie besitzen keine eigene Stoffwechselaktivität und sind außerhalb lebender Zellen biologisch inaktiv und nicht vermehrungsfähig. Ihre Infektionsfähigkeit geht dabei aber nicht zwangsläufig sofort verloren (Büttner 2007).

2.3.1.1 Allgemeiner Aufbau

Als Virion wird das komplette infektionstüchtige Viruspartikel bezeichnet. Einfach aufgebaute Viruspartikel bestehen aus einem Nukleinsäuremolekül und einem Proteinmantel (Capsid), der die Nukleinsäure schützend umschließt und stabilisiert. Diese beiden Einheiten werden zusammen als Nucleocapsid, Nucleoid oder Core bezeichnet. Das Capsid setzt sich aus Capsomeren zusammen, die wiederum aus Polypeptiden bestehen. Morphologisch stellt sich das Capsid, je nach Virusart, kubisch oder helikal dar. Das helikale Aufbauprinzip findet man bei vielen RNA-Viren. Die Nukleinsäure steuert die Art der Virusvermehrung, vermittelt die Infektiosität und codiert die Virusreproduktionsschritte. Viren, die zusätzlich noch eine äußere Membran aufweisen, stellen behüllte Virionen dar. Diese zweischichtige Hülle (Peplos) besteht aus Lipoproteinen der Zellmembran, in die virusspezifische Glykoproteine (Peplomere) eingebaut sind, welche unterschiedliche Formen aufweisen (spikeartig oder keulenförmig) und für die Infektiosität und Antigenität verantwortlich sind. Die chemische Charakterisierung eines Virions ist abhängig von dessen Nukleinsäure (DNA oder RNA), seinen Strukturproteinen und viruseigenen Enzymen und, wenn vorhanden, von der Hülle mit ihren virusspezifischen Proteinen. Physikalische Eigenschaften lassen sich anhand der Virusstruktur, Größe, Gestalt und Dichte des Virus ableiten. Die charakteristische Dichte behüllter Viren liegt zwischen 1,13 und 1,3 g/cm³ (Büttner 2007).

2.3.1.2 Allgemeine Taxonomie

Die Einteilung der Viren in die Systematik, sowie deren Nomenklatur übernimmt das International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Allerdings existiert noch keine vollständige und endgültige Klassifizierung (Taxonomie) der Viren. Momentan werden die Viren in Familien (*-idae*), diese z. T. in Subfamilien (*-virinae*) eingeteilt, in welchen die Genera (*-virus*) und Virusspezies eingeordnet werden. Als Grundlage für die Einteilung der Virusfamilien dienen u. a. folgende Kriterien:

1. die Nukleinsäurebeschaffenheit (DNA oder RNA, Einzel- oder Doppelstrang, positive oder negative Orientierung, kontinuierlich oder segmentiert).
2. die Morphologie (Symmetrie der Capside).
3. unbehüllt oder behüllt.

Aufgrund verbesserter Nachweismethoden ist es heutzutage möglich, teilweise die genetische Verwandtschaft der Viren durch Sequenzierung der Genome festzustellen (Büttner 2007).

2.3.1.3 Virusvermehrung

Die Virusvermehrung kann allgemein in zwei Stadien eingeteilt werden. Im Frühstadium findet die Adsorption, Penetration, Uncoating (Freisetzung der Nukleinsäure), Eklipse (während dieser Zeit der Replikation ist kein infektiöses Virus in der Zelle nachweisbar), Transkription, Translation und Maturation mit Assembly (Zusammenbau der Nucleocapside und Umhüllung) statt. Das Spätstadium umfasst die Elution (Virusfreisetzung z. B. durch Budding = Knospung) und Persistenz des Virus, evtl. mit Transformation der Zelle.

Insbesondere bei Retroviren liegt oft eine okkulte (versteckte) Infektion vor, d. h. das Virusgenom ist meist für immer in das Genom der Zelle als Provirus integriert. Dabei ist das Provirus nicht aktiv und somit findet auch keine Virusvermehrung statt und infektiöse Partikel können nicht nachgewiesen werden. Unter bestimmten Bedingungen kann das Provirus aber wieder aktiviert werden und die Virusproduktion setzt ein. Zellen mit Proviren, z. B. Oncornaviren, sind empfänglich für Transformationen (Entartung zu Tumorzellen).

Die Folgen einer Virusinfektion können sich in verschiedenen morphologisch erfassbaren Zellveränderungen zeigen, so genannte zytopathische Effekte. Diese können schließlich mit dem Zelltod enden. Teilweise gibt es aber auch keine morphologisch erkennbaren Veränderungen und es besteht lediglich eine Dysfunktion der infizierten Zelle. Bestimmte Viren können auch eine Proliferation der Zellen hervorrufen oder gar eine Zelltransformation

(Retroviren). Viele Virusarten induzieren frühe zelluläre Veränderungen, wie z. B. Schwellung infizierter Zellen, Permeabilitätsänderungen der Membranen oder eine Zellfusion (Synzytienbildung). Retroviren sind nicht zytopathogen, rufen aber z. T. Synzytienbildung hervor (Mayr und Kaaden 2007). Auch zelluläre Kernveränderungen können auftreten, z. B. Kernpyknosis, Kernwandhyperchromasie und sonstige Degenerationsformen oder auch pathologische Mitosefiguren. Zytoplasmatische Veränderungen zeigen sich in Form von Zellabrundungen, Einschlusskörperchen oder/und Vakuolisierung. Durch Einschlusskörperchen kann es zur Kern- und Zytoplasmaverdrängung kommen. Intraplastische Einschlusskörperchen werden von bestimmten RNA-Viren (Zytoplasmasythese) gebildet. In der HE-Färbung zeigen sie sich meist eosinophil, homogen, manchmal granuliert und von der Umgebung gut abgegrenzt. Sie variieren in Form, Größe und Anzahl. Normalerweise werden sie peripher von einer ungefärbten Hofzone (Halo) umgeben. Meist sind sie Gebilde aus Viruspartikeln, Zellmatrix mit virusspezifischen Proteinen oder sie bestehen aus Zellmaterial, das aufgrund des Virus gebildet wurde. Allerdings können ähnliche Einschlüsse auch als Folge von Stoffwechselstörungen entstehen (Büttner 2007). Jacobson (2007) erwähnte, dass nicht alle Einschlüsse viraler Natur sind und nicht alle viralen Infektionen Einschlüsse induzieren.

2.3.1.4 Virusdiagnostik

Bei der Virusdiagnostik stehen drei Möglichkeiten zur Verfügung (Büttner 2007):

1. Direkter Nachweis von Virus, Virusnukleinsäure oder Virusantigenen mit anschließender Virustypisierung, z. B. mittels der Elektronenmikroskopie, anhand vorhandener Einschlusskörperchen, ELISA oder PCR (hierbei müssen intakte Nukleinsäuren vorhanden sein).
2. Isolierung eines Virus über seine Anzucht in geeigneten Zellkultursystemen mit anschließender Virustypisierung. Dazu sind lebende Viren nötig.
3. Indirekter Nachweis einer Virusinfektion anhand der Immunantwort des Patienten (spezifischer Antikörpernachweis), z. B. durch ELISA oder Neutralisationstest. Wellehan und Johnson (2005) unterscheiden noch zusätzlich zwischen der humoralen Immunantwort (Antikörperproduktion gegen Antigene), welche durch Serumneutralisationstests, ELISA, Hämagglutinationshemmungstests oder Agarosegelimmunodiffusionstests festgestellt werden kann und der zellulären Immunantwort, bei der die T-Zellproliferation untersucht

wird. Die T-Zellen lösen die Selbstzerstörung der infizierten Wirtszellen aus und bieten einen effektiven Schutz gegen Viren.

Aufgrund der meist kurzen Krankheitsdauer ist es schwierig, den Erreger nachzuweisen, zumal der Nachweis einen erheblichen zeitlichen als auch labortechnischen Aufwand erfordert (Mayr und Kaaden 2007).

2.3.1.5 Therapie und Prophylaxe

Wellehan und Johnson (2005) führen wichtige Maßnahmen für die Kontrolle und Therapie bei Viruserkrankungen an. Besonderes Augenmerk sollte auf die Korrektur der Haltungsbedingungen gerichtet werden, wie z. B. Futter, Temperaturbereich, Feuchtigkeit, Terrarieneinrichtung und auch der Umgang mit den Tieren spielt dabei eine Rolle. Zusätzlich sollten bei Bedarf unterstützende Maßnahmen ergriffen werden, z. B. eine Infusionstherapie und Behandlung der Sekundärinfektionen. Als allgemeine Maßnahme können Paramunitätsinducer eingesetzt werden, um die unspezifische Abwehr zu stimulieren. Unter Umständen können antivirale Medikamente eingesetzt werden (Acyclovir, Cidofovir).

Eine Anwendung antiviraler Substanzen ist sinnvoll, wenn eine Virusausbreitung im Organismus und damit der Krankheitsausbruch noch verhindert oder abgemildert werden kann. Beispielsweise können bei monokausalen Infektionskrankheiten, bei lokalen Infektionen oder bei langsamer Virusausbreitung antivirale Chemotherapeutika eingesetzt werden. Die Virostatika haben unterschiedliche Wirkungsweisen. Sie können z. B. als Nucleosidanaloga die Virusgenomsynthese stören, indem sie falsche Nucleoside ins Genom einbauen und somit unbrauchbare virale Proteine synthetisiert werden. Azidothymidin (3'-Azido 3'-desoxythymidin, AZT) z. B. wird in Retrovirus infizierten Zellen durch zelluläre Enzyme umgebaut und interagiert danach mit der reversen Transkriptase. Es zeigt eine gute Wirkung gegen das feline Immundefizienzvirus (FIV) (Büttner 2007).

Wichtig bei der Bekämpfung retroviraler Infektionen ist die Unterbrechung der Infektkette (Liebermann 1992). Allgemein sind virusbedingte Erkrankungen ätiologisch schwer zu therapieren, da Viren obligate Zellparasiten sind (Mayr und Kaaden 2007).

Eine wichtige prophylaktische Maßnahme ist, Tiere auf entsprechende Krankheiten hin zu untersuchen, und dies nach einer mindestens 90tägigen Quarantänezeit zu wiederholen. Die Unterscheidung zwischen unbehüllten und behüllten Viren ist maßgeblich, da letztere wesentlich instabiler sind und oft schon korrekt durchgeführte hygienische Vorkehrungen ausreichen, um die Verbreitung zu verhindern. Bei den stabileren Viren wird empfohlen,

positiv getestete sowie verdächtige Tiere aus dem Bestand zu entfernen (Wellehan und Johnson 2005).

Die Inaktivierung von Viren hängt von ihrer Tenazität (Widerstandsfähigkeit gegenüber Umwelteinflüssen) ab. Zellfreies Virus (z. B. in Speichel oder Futtermitteln) ist deutlich labiler als zellgebundenes Virus, das in Zellen oder Geweben vorliegt. Physikalische Einflüsse, v. a. Hitze, Strahlen oder ein ungünstiger pH-Wert im Milieu, schädigen die Viren. Behüllte Viren sind sehr sensitiv gegenüber Lipidlösungsmitteln. Der Einsatz von Desinfektionsmitteln ist sehr effektiv gegen Viren. Dazu wird vorwiegend Formaldehyd verwendet. 2 %ige Natronlauge ist zwar wirksam, aber auch aufgrund umwelttechnischer Gründen eher begrenzt einsetzbar. Empfehlenswert ist auch der Einsatz von Natriumhypochlorid, dessen Wirkung zuverlässig ist. Vor jeder Desinfektion ist zu beachten, dass eine gründliche Reinigung vorausgeht. Und die jeweiligen Einwirkungszeiten müssen unbedingt beachtet werden (Büttner 2007).

2.3.2 Retroviren allgemein

(Akronym: Reverse-Transkriptase-Onkogene Viren)

2.3.2.1 Taxonomie

Die Familie *Retroviridae* wird heutzutage in sieben Genera eingeteilt: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Delta-*, *Epsilonretrovirus*, *Spuma-* und *Lentivirus* (Mayr und Kaaden 2007). Laut der zurzeit verbindlichen Taxonomie der Retroviren durch das ICTV (2009) werden diese aufgrund ihrer genetischen Verwandtschaftsverhältnisse (u. a. durch Sequenzierung und Vergleich der relativ konservierten Polymerasegene) zusätzlich in übergeordnete Unterfamilien eingeteilt: 1. Subfamilie *Orthoretrovirinae* mit Genera *Alpha-* bis *Epsilonretrovirus* und *Lentivirus* und 2. Subfamilie *Spumaretrovirinae* mit Genus *Spumavirus*.

Die bei Reptilien nachgewiesenen Retroviren gehören zum Genus *Gammaretrovirus/ Mammalian-Typ C Retrovirus* bzw. *MLV-related Virus* und werden dem Subgenus *Reptilian Typ-C Virus* zugeteilt, welcher das Viper Retrovirus enthält (Mayr und Kaaden 2007).

Früher wurden RNA-Tumoviren mit onkogenen Eigenschaften, z. B. aviäre Sarkom- und Leukoseviren, der Subfamilie *Oncovirinae* zugeordnet (Liebermann 1992). Tumorbildende Virusarten (Oncornaviren) besitzen die Fähigkeit u. a. Leukose bei Vögeln und einigen Säugetieren auszulösen. Außerdem können sie auch solide Tumoren wie Lymphome, Sarkome oder Adenocarcinome verursachen. Retroviren stehen auch in Verbindung mit chronischem Gewichtsverlust, neurologischen Erkrankungen, Immundefizite und Autoimmunkrankheiten (Ritchie 2006). Einige Oncornaviren sind in natürlichen Wirten endogen vorhanden (Mayr und Kaaden 2007).

Coffin et al. (1997) ordneten sowohl das Viper Retrovirus VRV als auch das Corn snake Retrovirus CSRV dem Genus *Mammalian Typ-C* zu. Wobei beide Virusarten endogen vorkommen.

Manche Retroviren sind „ekotrop“ (vermehren sich nur im natürlichen Wirt), andere sind „xenotrop“ (vermehren sich nicht in Wirtszellen, in denen sie endogen vorkommen). Es kommen auch „amphotrope“ Virusarten vor (vermehren sich in mehreren Spezies, einschließlich in Zellen des natürlichen Wirts) (Mayr und Kaaden 2007).

2.3.2.2 Eigenschaften und Morphologie

Liebermann beschrieb 1992 die Eigenschaften von Retroviren. Allgemein besitzen die meisten Retroviren eine starke Affinität zu den Zellen des lymphoretikulären und hämatopoetischen Gewebes (B- und T-Lymphozyten, Makrophagen). Sie kommen weltweit vor und sind wirtsspezifisch. Ihr charakteristisches Merkmal ist die reverse Transkriptase (RNA-abhängige DNA-Polymerase), ein Enzym, das die einsträngige RNA in einem mehrstufigen Prozess in komplementäre DNA (cDNA) umschreibt. Sie ist im Viruskern lokalisiert und erst nach Zerstörung der Viruspartikel nachweisbar. Unabhängig davon, ob ein Retrovirus onkogene Eigenschaften besitzt oder nicht, kommt die reverse Transkriptase bei allen replikationsfähigen Retroviren vor.

Die taxonomische Unterteilung der Retroviren erfolgt nach unterschiedlichen Merkmalen, z. B. der Morphologie (A-, B-, C- und D-Typ Viren) aber auch nach ihren biologischen Verhaltensweisen oder ihren genetischen Merkmalen, wie oben bereits erwähnt (Büttner 2007).

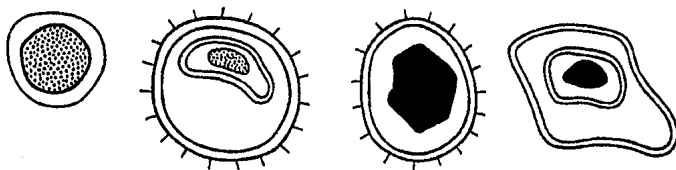


Abbildung 1: Morphologie der Typ-A-, -B-, -C- und -D-Retroviruspartikel (Liebermann 1992)

Typ-A Viren kommen nur intrazytoplasmatisch vor. Als einzig bekannte Viren sind Cisternaviren zu nennen, die bei Maus, Hamster und Meerschweinchen gefunden wurden. Diese Viren werden als Vorstufen der extrazellulär vorkommenden Typ-B und Typ-D Viren angesehen und sind vermutlich nicht infektiös.

Bei der Gattung Typ-B Oncoviren ist als Prototyp das Mammatumovirus der Maus (MMTV) vertreten. Diese entstehen aus Typ-A Partikel als Vorläufer, werden durch die Plasmamembran ausgeschleust und besitzen somit eine doppelschichtige Hülle. Reife und infektiöse Viruspartikel haben einen Durchmesser von 125-130 nm, ihr elektronendichtes Nucleoid liegt exzentrisch und sie weisen Spikes auf ihrer Oberfläche auf.

Die Typ-C Viren bilden zwei Gattungen:

- *Typ-C Oncovirusgruppe*: diese Gattung enthält die meisten Vertreter der Retroviren, wovon viele ein onkogenes Potential besitzen, was auch Mayr und Kaaden (2007) bestätigten. In den Subgattungen sind Säugetier-, Vogel- und Reptilien Oncoviren des C-Typs eingeteilt. Zu der Untergattung *Reptilien Typ-C Oncovirus* gehört die Spezies des *Viper Typ-C Oncovirus*, das dem Viper Retrovirus entspricht. Liebermann und Wittmann erwähnten bereits 1987, dass die Typ-C Oncoviren der Reptilien keine antigenetische Verwandtschaft zu anderen Mitgliedern der Subfamilie *Oncovirinae* aufweisen, und somit vermutlich ein eigenes Genus darstellen.

- *Mammalian-Typ C Retrovirusgruppe*: diese Gruppe enthält sowohl exogene als auch endogene Viren, die weit verbreitet sind; die Übertragung erfolgt vertikal und horizontal. Sie werden mit vielen Krankheiten in Verbindung gebracht, einschließlich Immunsuppression und neurologischen Störungen.

Typ-D Viren kommen als unreife Partikel intrazellulär vor und weisen einen Durchmesser von 60-90 nm auf. Dagegen haben die extrazellulären reifen, infektiösen Partikel einen Durchmesser von 100-120 nm, besitzen relativ kurze Oberflächenprojektionen und ihr elektronendichtes Nucleoid liegt exzentrisch. Ihnen werden keinerlei onkogene Eigenschaften zugesprochen (Liebermann 1992).

Morphologisch stellen sich die behüllten Typ-C Retroviruspartikel sphärisch dar, mit einem Durchmesser von 80-110 nm (bzw. 80-120 nm, Mayr und Kaaden 2007). Sie werden von einer Lipoproteinmembran umgeben, die variable Oberflächenprojektionen (Spikes) von ca. 8 nm Länge enthält und nur bei frei liegenden Typ-C Viren sichtbar sind. Die Hüllmembran stammt von der Wirtszelle ab. Die Virionen besitzen ein ikosaedrisches Capsid, das ein Ribonucleoprotein mit helikaler Symmetrie enthält. Das Nucleoid ist elektronendicht und liegt bei den C-Typ Partikeln zentral. Es stellt ein reifes Viruspartikel dar, während unreife Partikel einen konzentrisch lokalisierten, elektronendurchlässigen Kern enthalten. Die Reifung der Typ-C Viren erfolgt an der Zellmembran. Die Replikation der Retroviren findet dagegen im Zellkern statt (Büttner 2007).

Das Genom der Retroviren ist ein invertiertes Dimer einer linearen ssRNA mit positiver Polarität, das am 5'-Ende mit Wasserstoffbrücken verbunden ist. An beiden Molekülen befinden sich repetitive Sequenzen, die so genannten LTRs (Long terminal repeats), welche als starke Promotoren fungieren. Sie leiten die Transkription des integrierten Virusgenoms ein und liegen in mehrfacher Ausführung an der viralen DNA vor. Die virale RNA alleine stellt

kein infektiöses Agens dar. Sie kann aber gleich nach der Zellinfektion direkt als mRNA auftreten (Liebermann 1992).

2.3.2.3 Genomorganisation und Replikation

Es gibt 4 Genomabschnitte, die wichtige genetische Informationen enthalten:

- *gag* - Gen kodiert für interne nicht glykosylierte Strukturproteine (Matrix, Capsid, Nucleocapsid)
- *pol* - Gen kodiert für reverse Transkriptase (mit RNase) und Integrase (Polymerase und Endonuclease, welche dsDNA schneidet)
- *env* – Gen kodiert überwiegend für glykosylierte Hüllproteine
- *pro* – Gen kodiert für eine Protease
- manche Retrovirusgenome enthalten ein zusätzliches *onc* – Gen, ein so genanntes Krebsgen, das ihnen ein onkogenes Potential verleiht.

Die Virionproteine tragen verschiedene Determinanten, welche für die antigene Eigenschaft verantwortlich sind. Als typenspezifische Determinanten werden Hüllglykoproteine bezeichnet, die bei der Virusneutralisation eine Rolle spielen (Bildung neutralisierender Antikörper). Außerdem gibt es gruppenspezifische Determinanten, welche die Subgenera definieren, wie sie z. B. die Typ-C Viren der Säugetiere besitzen. Diese werden vom *gag* – Gen kodiert.

Der Replikationszyklus der Retroviren läuft wie folgt ab: Nach der Infektion bindet das Retrovirus mit einem seiner Hüllglykoproteine an spezifische Rezeptoren der Wirtszelloberfläche. Danach kommt es zur Fusion der Virushülle mit der Zytoplasmamembran. Es folgt das Uncoating, bei dem die Virushülle abgebaut wird. Die Replikation startet mit der reversen Transkription der Virion-RNA in ssDNA. Danach baut die RNase-H die RNA von dem DNA/RNA-Hybriddoppelstrang ab. Ein zweiter DNA-Strang wird synthetisiert, so dass eine dsDNA entsteht. Diese dsDNA entspricht einer cDNA und wird als Provirus bezeichnet. Es folgt die Integration der retroviralen cDNA in die chromosomale DNA der Wirtszelle. Dies geschieht durch die virale Integrase. Damit bleibt der Wirt lebenslang (latent) infiziert. Bei der nachfolgenden Transkription durch die zelluläre RNA-Polymerase II entsteht virale RNA und verschieden große mRNA, welche unterschiedliche Informationen für die Translation der jeweiligen Gene enthalten. Die meisten primären Translationsprodukte der Retroviren sind Polyproteine, die gespalten werden müssen (spleißen), um biologisch aktiv zu werden. Beim C-Typ findet die Reifung der Retroviren an der Plasmamembran statt. Die

Freisetzung aus der Zelle geschieht durch einen charakteristischen Abschnürungsprozess, dem so genannten Budding.

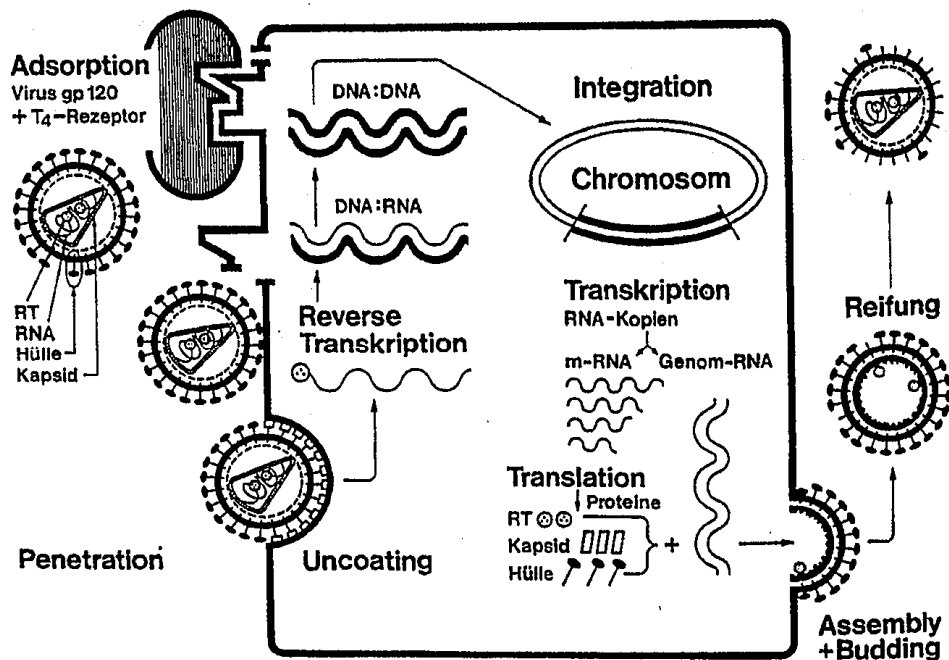


Abbildung 2: Replikation der Retroviren (nach Gelderblom)

2.3.2.4 Übertragung, Verlauf und Diagnose

Die Infektion erfolgt meist exogen, wobei eine Übertragung vertikal oder horizontal möglich ist. Es kommen auch endogene Infektionen vor. Retroviren sind nicht besonders kontagiös, da sie außerhalb des Organismus sehr labil sind. Sie können durch Lipidlösungsmitteln, Detergenzien oder Hitze (56 °C für 30 Minuten) inaktiviert werden. Ihr Verhalten gegenüber UV-1- und Röntgenstrahlung ist relativ resistent.

Klinisch gibt es verschiedene Verlaufsformen. Meist verläuft die Infektion inapparent mit Antikörperbildung gegen Virusantigene und gegen tumorspezifische Transplantationsantigene auf den infizierten Wirtszellen. Damit werden die Tiere immun, ohne zu erkranken. Bei persistierenden Virusinfektionen sind keine Krankheitssymptome sichtbar, die Tiere sind aber Virämiker und stellen dadurch eine Ansteckungsquelle dar.

Für die diagnostischen Maßnahmen stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Als Nachweis für die Retroviren wird das Elektronenmikroskop zu Hilfe genommen. Auch der Nachweis der reversen Transkriptase ist möglich. Bei bekannter Virus-RNA ist eine Hybridisierung mit cDNA Proben durchführbar. Weitere immunologische Nachweise viraler

Strukturproteine gelingen durch Agargelpräzipitation, ELISA, Radioimmunpräzipitation u. a (Liebermann 1992).

Auch durch Bestimmung des Sucrose-Dichtegradienten ist eine nähere Einteilung der Viren möglich. Die Sucrosedichte der Retroviren beträgt 1,13-1,18 g/cm³ (ICTV).

2.3.3 Retroviren bei Boiden

In der Literatur wird von Isolationsversuchen verschiedener Retroviren berichtet.

Das Ziel der Studie von Jacobson et al. (2001) war die Charakterisierung von Retroviren, die aus boiden Schlangen mit und ohne IBD isoliert wurden. Dabei entdeckten die Autoren drei Isolate (RV-1, -2, -3), die aus infizierten VH2-Zellen (Viper heart cells) stammten und eine Morphologie vergleichbar mit Vertretern der Familie *Retroviridae* aufwiesen, welcher sie auch zugeordnet wurden.

Für diese Untersuchung standen drei Boas zur Verfügung. Eine Abgottschlange (*Boa constrictor constrictor*) mit Lethargie und Abmagerung, eine Argentinische Boa (*Boa constrictor occidentalis*) mit intermittierender Regurgitation und zentralnervösen Störungen und eine Madagassische Erdboa (*Acrantophis madagascariensis*), die gesund war, aber eines der Wurfgeschwister wurde mittels einer Leberbiopsie als IBD positiv diagnostiziert. Folgende histopathologischen Befunde traten auf: hepatische Lipidose, chronische interstitielle Pneumonie, neuronale Degeneration. Vereinzelt auch nekrotisierende Hautveränderungen und Milzfibrose. Einschlusskörper wurden in Leber, Lunge, Neuronen, vereinzelt auch in Milz, Niere, Magen, Pankreas und auch in Kardiomyozyten gefunden.

Die Autoren untersuchten infizierte VH2-Zellen unter dem TEM. Darunter fanden sie intrazytoplasmatische Aggregate von C-Typ retroviralen Partikeln in Vakuolen und Phagosomen. Diese schnürten sich vom rauen Endoplasmatischen Retikulum ab. Unreife Viruspartikel, deren Nukleinsäure einen asymmetrischen, elektronendichten Halbmond bildete, waren ebenso sichtbar wie reife Viren, die einen zentralen, elektronendichten Kern besaßen, der von einem Capsid mit einem Durchmesser von 80-90 nm umgeben wurde.

Im Vergleich dazu kamen in infizierten primären Nierenzellen extrazelluläre sowie intrazytoplasmatische C-Typ retrovirale Partikel vor. Die viralen Partikel stellten sich allesamt pleomorph dar und reife Partikel hatten 80-100 nm im Durchmesser. Zusätzlich sahen die Autoren in diesen infizierten primären Nierenzellkulturen unter dem TEM im Zytoplasma liegende, elektronendichte IBD typische Einschlüsse, die Viren aufwiesen. Mittels Spezialfärbungen fanden Jacobson et al. (2001) heraus, dass die Einschlusskörper Lipide und Proteine enthielten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass Einschlusskörper entweder ein Ablagerungsprodukt in abnormen Zellen oder prävirales Material darstellen, das für die Replikation benötigt wird.

Mit dieser Studie vermuteten Jacobson et al. (2001) die Anwesenheit eines endogenen Retrovirus. Diese Vermutung stützte sich auf das Vorhandensein einer hohen Hintergrund-

radioaktivität bei der Messung der reversen Transkriptaseaktivität nicht infizierter VH2-Zellen.

Um die viralen Proteine zu analysieren, und damit die strukturelle und antigenetische Verwandtschaft von RV-1 und RV-2 beurteilen zu können, wurden polyklonale Antikörper (anti-RV-1) im Western Blot eingesetzt, die gegen das gereinigte mutmaßliche IBD Virus gerichtet waren. Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Hauptkernproteine von RV-1 und RV-2 im Western Blot vom endogenen Retrovirus aus den VH2-Zellen unterschieden. Damit wurde bestätigt, dass unterschiedliche Retroviren vorlagen.

Die Gesamtergebnisse dieser Studie bestätigten das Vorhandensein von Retroviren in boiden Schlangen mit IBD bzw. Schlangen, die Kontakt zu IBD positiven Tieren hatten. Es liegt aber kein Beweis vor, ob diese Retroviren tatsächlich für IBD verantwortlich sind.

Huder et al. (2002) versuchten in ihrer Studie herauszufinden, welcher Erreger für IBD verantwortlich ist. Sie gingen davon aus, dass es sich um ein Retrovirus handelt, da diese Vermutung schon länger Bestand hat (Schumacher et al. 1994). Diese Theorie konnte jedoch noch nie bestätigt werden. Die Tiere zeigten IBD Symptome oder lebten vergesellschaftet mit erkrankten Schlangen. Für ihre Untersuchungen nutzten die Autoren Leukozytenkulturen, die von Tigerpythons (*Python molurus*) stammten, um darin die reverse Transkriptaseaktivität zu bewerten. In der Messkurve zeigte sich die reverse Transkriptaseaktivität bei 1,15 g/ml. Somit wurde die Anwesenheit retroviraler Partikel bestätigt. Durch phylogenetische Analysen konnte eine weit entfernte Verwandtschaft des Virus mit Viren des B- und D- Typs (Integrase und reverse Transkriptase) und dem Säugetier C-Typ (u. a. Hüllproteine) festgestellt werden. Es wurde als „Python endogenes Retrovirus“ (PyERV) bezeichnet. Möglicherweise könnte es sich dabei auch um ein rekombiniertes Retrovirus handeln. Bei allen *Python molurus* Individuen konnte dieses stark exprimierte Virus nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden sämtliche anderen Schlangen der Familie *Boidae* negativ für dieses Virus getestet (*Python regius*, *Python reticulatus*, *Boa constrictor*, *Eunectes notaeus* und *Morelia spilota*), egal ob die Tiere IBD positiv waren oder nicht. Auch Übertragungsversuche des isolierten *Python molurus* Virus aus einer gesunden Dunklen Tigerpython (*Python molurus bivittatus*) auf mononukleäre Blutkulturen von *Boa constrictor* oder *Python regius* gelangen nicht. Somit konnte den Python endogenen Retroviren (PyERV) keine ursächliche Beziehung zu IBD zugesprochen werden. Ebenfalls als Beweis gegen die ätiologische Rolle von PyERV für IBD sprach die Tatsache, dass PyERV nicht in histologisch bestätigten Einschlusskörper-positiven Nierengewebe von Königsschlangen gefunden werden konnte, welche klinisch als IBD positiv diagnostiziert wurden. PyERV konnte in die bisherigen sieben Genera aufgrund seiner

unterschiedlichen Sequenz und Genomfolge nicht eingeordnet werden. Die in dieser Studie beschriebenen Ergebnisse schließen die Möglichkeit nicht vollends aus, dass ein mutmaßliches Retrovirus, das mit PyERV verwandt sein könnte, als Ursache für IBD in Frage kommt.

Lock et al. (2003) entwickelten einen ELISA in Boas, um die Immunantwort bei diesen Tieren messen zu können. Dafür wurden zwei Argentinische Boa constrictor (*Boa constrictor occidentalis*) mit 2,4-Dinitrophenylat Bovinem Serumalbumin (DNP-BSA) immunisiert. Die entwickelten Antikörper (anti-DNP) wurden genutzt, um polyklonale und monoklonale Antikörper zu produzieren.

2005 setzten Lock und Jacobson diesen ELISA ein, um das Plasma frei lebender Brasilianischer Kaiserboas (*Boa constrictor imperator*) auf einen Kontakt mit Retroviren hin zu untersuchen, die kürzlich aus Boiden mit IBD isoliert wurden (Jacobson et al. 2001). Das Ergebnis ergab eine Übereinstimmung zwischen Proben und Negativkontrolle. Dies könnte ein Beweis dafür sein, dass die wildlebenden Kaiserboas keinen Kontakt zu diesem Retrovirusisolat hatten.

2.3.3.1 Retroviren bei Boiden in Verbindung mit Neoplasien

Die von Ippen et al. (1978) beschriebenen zwei Abgottschlangen (*Boa constrictor constrictor*), zeigten zu Lebzeiten keinerlei Anzeichen für das Vorliegen einer leukotischen Erkrankung. Die Autoren berichteten hier von den pathologisch-anatomischen und elektronenmikroskopischen Befunden.

Bei Boa Nr. 1 untersuchten die Autoren im Elektronenmikroskop Organe mit lymphoiden Zellanhäufungen. Dabei entdeckten sie Viruspartikel mit einem Durchmesser von 100 nm, einem zentral gelegenen abgegrenzten Nucleoid, das von einem hellen Ring umgeben wurde, und einer peripheren Hüllmembran. Es wurde angenommen, dass es sich dabei um RNA Viruspartikel des C-Typs der Leukosegruppe handelte. Die morphologischen Befunde (tumorartiges Wachstum undifferenzierter primitiver Blutzellen) sprachen für eine vorliegende Leukose. Auch bei der zweiten untersuchten Boa fanden die Autoren elektronenmikroskopisch die oben beschriebene Viruspartikel in allen veränderten Organen und in Blutgefäßen. Aufgrund der erhobenen Befunde lautete die Diagnose Erythroleukose. Ippen et al. (1978) konnten somit in dieser Studie als Erste die typischen Viruspartikel des C-Typs direkt im lymphatischen Tumorgewebe nachweisen. Dadurch wurde angenommen, dass der

Auslöser für die Leukose bei Reptilien ein Virus der Familie *Retroviridae*, Genus *Oncornavirus C* ist.

Chandra et al. (2001) entdeckten in Neoplasien von vier Dunklen Tigerpythons (*Python molurus bivittatus*) Retroviren, welche sie in ihrem Artikel beschrieben. Dabei konnte die Beziehung zwischen Tumorätiologie und den intraneoplastischen retroviralen Viruspartikel nicht geklärt werden. Folgende Tumorarten diagnostizierten die Autoren bei den Tieren: ein Lymphosarkom, ein muzines Kolonadenokarzinom, ein Übergangszellkarzinom in der rechten Niere und ein intermandibuläres Fibrosarkom. In allen Neoplasien lagen virale Partikel extra- und intrazytoplasmatisch vor, teilweise waren sie auch intravakuolär oder in Phagolysosomen vorhanden. Ihr Durchmesser lag bei ca. 93-96 nm und sie besaßen einen elektronendichten Kern, umgeben von einem elektronendurchlässigen Ring mit deutlicher bilaminärer Außenmembran. Der Knospungsprozess fand an Plasmamembranen statt. Die morphologischen Merkmale und die Lokalisation der Virionen stimmten mit Vertretern der Familie *Retroviridae* überein und ähnelten Typ-C Oncornaviruspartikeln. Deren reife Partikel hatten einen Durchmesser von 80-110 nm und die virale Nukleinsäure kondensierte halbmondförmig. Außerhalb der Tumorgewebe kamen weniger virale Partikel vor.

2.3.4 Retroviren bei Nichtboiden meist in Verbindung mit Neoplasien

Zeigel und Clark lieferten 1969 den ersten Beweis für die Existenz eines C-Typ Virus bei wechselwarmen Tieren durch die Elektronenmikroskopie. Aus einer Asiatischen Kettenviper (*Vipera russelli*) mit präkardialen ödematösen Myxofibrom wurde Milzgewebe entnommen und daraus eine beständige Zellkultur hergestellt, die Viper-Milz-Zelllinie (VSW). In der 48. und 52. Passage der Zellkultur konnte elektronenmikroskopisch ein C-Typ Virus nachgewiesen werden, das sich durch Knospungsprozesse vermehrte. Die zytoplasmatischen Virionen hatten einen Durchmesser von ca. 108 nm, waren behüllt, membrangebunden und besaßen ein elektronendichtes Nucleoid, welches einen Durchmesser von 45 nm aufwies. Diese Virionen kamen im Gewebekulturüberstand vor. Gelegentlich wurden Viruspartikel innerhalb großer Phagolysosomen und im Extrazellularraum gefunden. Laut Zeigel und Clark (1969) lag der Durchmesser des Viper Virus im selben Bereich wie die Erreger der aviären Leukose (85 nm) und der murinen Leukämie (110 nm), wobei es dem aviären Leukosevirus in seiner reifen extrazellulären Form morphologisch mehr ähnelte. Dieses C-Typ Virus wurde als Ophidian C-Typ Virus bezeichnet (später wurde es Viper Retrovirus (VRV) genannt, Clark et al. 1979) und stellte das erste Oncornavirus in Verbindung mit einer Neoplasie bei Reptilien dar. Dies war damals der einzige Fall, bei dem die Kultivierung von C-Typ Viruspartikeln aus wechselwarmen Vertebraten gelang.

Die spontane Viruspartikelproduktion der VSW Zellkultur machten sich weitere Autoren zu nutze und es wurden nähere Untersuchungen dieser Zelllinie vorgenommen (Gilden et al. 1970, Zeigel und Clark 1971, Lunger und Clark 1973).

Gilden et al. (1970) nutzten die von Zeigel und Clark (1969) hergestellte Viperzelllinie VSW, um die daraus produzierten Viren auf ihre biologische, biophysikalische und immunologische Eigenschaften hin zu untersuchen. Die Anwesenheit der C-Typ Partikel in dieser Zelllinie, sowohl extrazellulär als auch in Vakuolen, wurden mittels elektronenmikroskopischen Untersuchungen bestätigt. Der Partikeldurchmesser (100-110 nm) und die speziellen Merkmale der C-Typ Viren (v. a. die kondensierten Nucleoide) stimmten mit den Beobachtungen von Zeigel und Clark (1969) ebenso überein. Gilden et al. (1970) konnten in der vorliegenden Untersuchung nachweisen, dass das Virus RNA enthielt und eine Sucrose-dichte von 1,16 g/ml aufwies. Eine RNA mit hohem Molekulargewicht (70S) konnte extrahiert werden, welche für aviäre und murine C-Typ Viren charakteristisch ist. Allerdings entdeckten Gilden et al. (1970) in ihren Untersuchungen auch, dass das Viper Virus (Reptilien

C-Typ Virus) ein gruppenspezifisches Antigen besaß, das sich von den gut charakterisierten aviären und murinen Viren unterschied. Somit besteht ein antigenetischer Unterschied zwischen diesen C-Typ Viren.

Zeigel und Clark (1971) erläuterten histopathologische und ultrastrukturelle Aspekte des Tumorgewebes und einiger Organe (Leber, Milz, Nieren, Pankreas) der Kettenviper (*Vipera russelli*), die sie bereits 1969 untersucht hatten und dabei die Diagnose eines präkardialen ödematösen Myxofibroms stellten. Aus dem Tumor selbst konnte kein Virus isoliert werden. Auffällig waren intravaskuläre neoplastische Zellen in den untersuchten Organen, die teilweise auch die Blutgefäße verschlossen. Die Zellen des primären Fibroms, die intravasalen Zellaggregate und die von der Milz abstammenden Zelllinie VSW wiesen einige gemeinsame Merkmale auf: jeder Zelltyp enthielt kleine dichte Tonofibrillen, Desmosomen und Sekretgranula. Aufgrund der ähnlichen Morphologie vermuteten die Autoren einen metastatischen Ursprung. Wahrscheinlich metastasierte der Tumor auf hämatogenem Weg u. a. in die Milz und hinterließ somit auch die intravasalen Zellaggregate. Ob eine ätiologische Beziehung zwischen dem C-Typ Virus und dem Vipertumor bestand, konnte nicht bewiesen werden.

Lunger und Clark (1973) beschrieben in ihrem Bericht mutmaßliche Entwicklungsstadien von C-Typ Viruspartikeln. Die 1969 von Zeigel und Clark hergestellte permanente Milzzelllinie VSW wurde für diese Studie mit einem Tollwutvirus infiziert. Sowohl infizierte als auch nicht infizierte VSW Zellen wurden elektronenmikroskopisch untersucht und miteinander verglichen, wobei mehr Mitochondrien, welche Viruspartikel enthielten, in infizierten Zellen vorhanden waren. Diese intramitochondrialen Viruspartikel wiesen eine runde Form auf, mit einem Durchmesser von 106 nm, besaßen einen elektronendichten Kern, dessen Durchmesser 75 nm maß, und hatten im Allgemeinen eine elektronendurchlässige Außenzone, umgeben von einer eng anliegenden Hülle, die von der inneren Mitochondrienmembran abstammte. Die Autoren wiesen unter Vorbehalt darauf hin, dass die intramitochondrialen Partikel C-Typ Virionen sein könnten. Ihr Unterschied zu den Viper C-Typ Virionen bestand lediglich darin, dass ihr Nucleoiddurchmesser größer war und ihr Reifungsort innerhalb der Mitochondrien lag. Damit wäre dieses intramitochondriale Viper Milzzellvirus der erste entdeckte endogene Erreger, der in Mitochondrien liegt und sich vermutlich auch dort repliziert.

Andersen et al. (1979) fanden heraus, dass das Viper Retrovirus (1969 von Zeigel und Clark isoliert) biochemisch und immunologisch von einer Anzahl von Säugetier- und Vogelretroviren unterscheidbar ist. Außerdem stellten die Autoren eine immunologische Verwandtschaft zwischen VRV und endogenen Typ-D Viren der Altweltaffen fest. Sie teilten sich anti-

genetische Determinanten. Morphologisch bestand eine Ähnlichkeit mit den Typ-C Viren. Eine genetische Verwandtschaft zu den Vertretern der Typ-C Viren konnte allerdings nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich entdeckten sie durch molekulare Hybridisierung, dass das VRV innerhalb der Vipern genetisch übertragen werden kann, womit bewiesen wäre, dass dieses Virus endogen vorkommt.

Lunger et al. (1974) fanden im Gewebe eines embryonalen Rhabdomyosarkoms von einer Kornnatter (*Elaphe guttata*) mittels eines Elektronenmikroskops Partikel, die morphologisch C-Typ Viren von Vögeln und Säugetieren ähnelten. Dies stellte den ersten Bericht über einen poikilothermen Vertebraten dar, bei dem die Morphogenese von C-Typ Viruspartikeln innerhalb eines primären Tumorgewebes beschrieben wurde. Damit bestand eine direkte Verbindung mit dem Tumor. Die Knospung extrazellulärer Partikel fand an zytoplasmatischen Membranen statt. Sowohl extrazelluläre als auch intravakuoläre reife Partikel hatten einen Durchmesser von 105-115 nm und bestanden aus einer Hüllmembran, einer elektronendurchlässigen Zone und einem kondensierten zentralen Kern mit 45-55 nm im Durchmesser. Etwas kleinere freie Partikel befanden sich innerhalb membrangebundener zytoplasmatischer Einschlusskörperchen, bestehend aus feinen Fibrillen, die eine glatte Oberfläche aufwiesen. Es wurde vermutet, dass diese Einschlüsse lysosomale Organellen darstellen könnten, wobei die Zusammensetzung von Lysosomen heterogenerer Natur wäre. Die beschriebenen Partikel ähnelten in ihrer Morphologie und ihren Reifungsstadien nach den C-Typ Oncornaviren höherer Vertebraten. Dabei stimmte die Kerngröße dieses Retrovirus mehr mit den aviären Leukose- und Sarkomviren im Gegensatz zu leukämieverwandten Säugetierviren überein. Dafür spräche auch die phylogenetisch nähere Verwandtschaft der Reptilien zu den Vögeln als zu den Säugetieren. Das beschriebene Virus konnte allerdings nicht isoliert werden.

Clark et al. (1979) beschrieben das erste Mal das Corn Snake Retrovirus CSRV. Aus der VSW Zelllinie (Zeigel und Clark 1969, 1971) wurde das Viper Retrovirus VRV gewonnen und für vergleichende Untersuchungen herangezogen. Eine Gewebesuspension, welche von dem Rhabdomyosarkom einer Kornnatter stammte, die 1974 von Lunger et al. untersucht wurde, nutzten die Autoren dazu, Waldklapperschlangen-Fibromzellen (*Crotalus horridus*) zu infizieren. Nach mehreren Passagen konnten mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen C-Typ Viren nachgewiesen werden, was in nicht infizierten Zellkulturen nicht gelang. Auch normale Waldklapperschlangen-Zellkulturen, von Herz und Niere gewonnen, wurden mit der Virus enthaltenden Suspension des Originaltumors infiziert. Nach mehreren Zellpassagen zeigten sich im Elektronenmikroskop in beiden Zellsystemen von Herz und Niere ebenso C-Typ Viren.

Die Morphologie der CSRV stimmte mit bekannten C-Typ Virionen von poikilothermen und homiothermen Vertebraten überein. Auch der Knospungsprozess von Plasma- und Vakuolenmembranen glich den C-Typ retroviralen Partikeln, ebenso wie deren Dichte von 1,16 g/ml. Die Virionen aus der *Crotalus*-Zellkultur wiesen die gleiche Morphologie auf wie es bereits Lunger et al. (1974) beschrieben hatten. In ihrem Polypeptidaufbau unterschieden sich die CSRV und VRV teilweise voneinander. Es gab keinerlei Kreuzreaktionen zwischen den CSRV- und VRV-Hauptantigenen. Während CSRV aus Neuwelt-Colubriden isoliert wurde, stammten die VRV aus Altweltvipern. Somit stellen sie jeweils einzigartige Isolate der Ophidian Retroviren dar.

In ihrem Bericht beschrieben Zschesche et al. (1988) den ersten Leukämiefall bei einer Vierstreifennatter (*Elaphe obsoleta quadrivittata*). Sowohl unter dem Lichtmikroskop als auch im Elektronenmikroskop fanden die Autoren unreife leukämische Zellinfiltrate in den meisten Viszeralorganen und auch in Blutgefäßen. Elektronenmikroskopisch sahen sie zusätzlich in zytoplasmatischen Vakuolen morphologisch klassifizierte C-Typ Viruspartikel mit einem Durchmesser von 80-100 nm. Laut der vorliegenden Befunde kamen die Autoren zu der Diagnose einer lymphoblastischen Leukämie.

Carneiro et al. (1992) lieferten den ersten Bericht über das Vorkommen retrovirusähnlicher Partikel in Giftdrüsen gesund erscheinender Grubenottern (*Bothrops jararacussu*). Die Identifizierung dieser Viruspartikel geschah anhand morphologischer Merkmale im Elektronenmikroskop. Die Autoren fanden inter- und intrazellulär im Giftdrüsengewebe und in Gefäßlumina sowie im Bindegewebe C-Typ ähnliche reife Viruspartikel. Ihr Durchmesser maß 100 nm und der elektronendichte Kern lag meist zentral. Die umgebende Hofzone war mäßig elektronendurchlässig und eine deutliche bilaminäre Außenmembran war vorhanden. Die Knospung ging von Plasmamembranen aus und verschiedene Reifungsstadien waren sichtbar. Die Befunde erinnerten an Säugetier C-Typ Viruspartikel.

Es wurden auch Typ-A ähnliche Viruspartikel entdeckt, die hauptsächlich in Verbindung mit Membranen des Endoplasmatischen Retikulums standen. Ihr Durchmesser betrug 70-80 nm und sie hatten einen zentral liegenden, elektronendurchlässigen Kern (Durchmesser 28-30 nm), umgeben von einem elektronendichten Ring und einer mäßig elektronendichten Zone. Da die Partikel offenbar nicht durch das Gift abgebaut wurden, scheint nicht ausgeschlossen zu sein, dass eine Virusübertragung durch einen Schlangenbiss in empfänglichen Wirten möglich ist.

Oros et al. (2004) beschrieben als Erste ein metastatisches intestinales Adenokarzinom bei einem Hundskopfschlinger (*Corallus caninus*), in dem Viruspartikel entdeckt wurden, welche

mit den Membranen des rauen Endoplasmatischen Retikulums in Verbindung standen. Der Durchmesser der viralen Partikel maß 70-80 nm und ihr zentral gelegener mäßig elektronendichter Kern, mit einem Durchmesser von 27-30 nm, war von einem elektronendichten Ring umgeben. Morphologisch entsprachen die Virionen Typ-A retroviralen Partikeln der Familie *Retroviridae*. Ob ein ätiologischer Zusammenhang zwischen den Typ-A Partikeln und dem Adenokarzinom besteht, ist ungewiss.

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchte Tiere

Für die vorliegende Arbeit wurden insgesamt 26 Riesenschlangen untersucht. Davon waren 17 Boas und 9 Pythons. Diese Tiere stellten entweder Patienten der Klinik für Fische und Reptilien der LMU München dar oder stammten aus der Reptilien-Auffangstation, die der Klinik angegliedert war. Die Tiere zeigten mehr oder weniger verdächtige Symptome für IBD oder wiesen keinerlei Symptomatik auf.

Auch wenn IBD nicht zu 100 % auszuschließen ist, werden in dieser vorliegenden Dissertation Schlangen, welche keinerlei Einschlusskörper im Blutaussstrich und/oder in der Leber bzw. den Organen aufwiesen, als IBD negativ bzw. nur als negativ bezeichnet.

Tabelle 1: Ein Überblick über die Tiere, die im Rahmen der Dissertation untersucht worden sind

Nummer	Art	Geschlecht	Gewicht (kg)
1	1	0,1	3,28
2	1	0	0
3	2	0,1	5,75
4	2	1	3,50
5	1	0,1	9,55
6	1	1	2,30
7	1	0,1	0,88
8	2	0,1	0
9	5	1	4,36
10	4	0	0
11	4	0	0
12	3	1	3,20
13	3	1	1,29
14	3	0	15
15	4	1	0,73
16	4	1	0,79
17	2	0,1	3,70
18	2	1	8,30
19	1	1	1,90
20	1	0,1	1,70
21	1	1	5,70
22	1	1	1,20
23	1	0,1	1,60
24	4	1	0,55
25	2	0,1	9,50
26	2	1	2,21

Art: 1 = Abgottschlange (*Boa constrictor constrictor*); 2 = Kaiserboa (Kolumbien) (*Boa constrictor imperator*); 3 = Tigerpython (*Python molurus molurus*); 4 = Königspython (*Python regius*); 5 = Teppichpython (*Python spilotus*); Geschlecht: 1 = männlich; 0,1 = weiblich; 0 = keine Angaben

3.2 Klinische Allgemeinuntersuchung

Vor der Leberbiopsie bzw. der Sektion wurden sämtliche Tiere einer klinischen Untersuchung unterzogen. Grundlage dazu gab die Definition der Gesundheit (Pschyrembel 2002), die dazu dienen sollte, die angenommenen klinisch gesunden bzw. unauffälligen Tiere als solche zu beschreiben oder die Tiere als klinisch auffällig einzuordnen. Die Definition lautet: „Gesundheit ist ein Zustand völligen körperlichen Wohlbefindens und das Fehlen körperlicher Störungen oder Veränderungen“, d. h. die Schlangen sollten keine Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens zeigen und keine adspektorischen Auffälligkeiten aufweisen. Dabei wurde der Pflege- und Ernährungszustand beurteilt, ob die Tiere gut im Futter standen oder eher mager waren und ob sie evtl. eine chronische Regurgitation zeigten. Bei der Adspektion der Haut lag das Augenmerk besonders auf das Vorhandensein von Ektoparasiten (z. B. Milben). Als klinisch unauffällig konnten die Tiere bezeichnet werden, die keinerlei Abweichungen vom Normalverhalten und Normalzustand aufwiesen. Gab es hingegen auffällige Veränderungen im äußeren Erscheinungsbild (z. B. Häutungsstörungen, trübe Brille), bei der Atmung (Maulatmung, Schleim im Maul) oder im Verhalten (z. B. ZNS-Störungen wie Stargazing, Opisthotonus, Koordinationsstörungen, reduzierter Umkehrreflex, Anisokorie), lieferte das einen Hinweis auf eine vorliegende Erkrankung, differentialdiagnostisch u. a. auf IBD. Auch die Körperhaltung und die Bewegung der Tiere können Auskunft darüber geben, in welchem Zustand sich die Schlange befindet. Ein unphysiologischer Muskeltonus könnte z. B. durch eine untypische Lage im Terrarium auffallen (verkrampftes Erscheinungsbild, untypische paralytische Lage). Ebenso wurde auf unspezifische Symptome geachtet, wie z. B. Inappetenz, Apathie oder Dehydratation. Dementsprechend konnten die Tiere im Anschluss an die Allgemeinuntersuchung in klinisch auffällig oder unauffällig eingeteilt werden. Dabei zeigten von den insgesamt 26 Schlangen 14 Boas und 8 Pythons mehr oder weniger klinisch ausgeprägte Symptome, während 4 Tiere gesund erschienen.

3.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme bei den Schlangen erfolgte an der Schwanzvene (*Vena coccygealis ventralis*). Im mittleren Drittel des fixierten Schwanzes, unter Schonung der Hemipenistaschen, fand der Einstich statt, senkrecht bis auf die Wirbelsäule mit anschließender Aspiration. Zur Entnahme wurde eine 1 ml Spritze mit aufgesetzter Kanüle (grün, 21 Gauge) verwendet. Davor erfolgte jeweils eine Spülung von Kanüle und Spritze mit Heparin (1000 I.E./ml), um eine Koagulation zu vermeiden. Es wurden jeweils 0,3-1,0 ml Blut entnommen und in ein Lithium-Heparin-Röhrchen (Firma Sarstedt, Füllvolumen: 1,3 ml) umgefüllt, damit es für die Weiterverarbeitung stabil blieb. Das Umfüllen des Blutes aus der Spritze in die Küvette geschah ohne Kanüle, um eine mögliche Zerstörung der Blutzellen zu vermeiden.

3.4 Blutausstrich

Für die Herstellung der Blutausstriche kamen jeweils zwei Objektträger zum Einsatz. Ein Blutstropfen des heparinisierten Blutes wurde auf ein Ende des Objektträgers pipettiert. Gleich im Anschluss wurde der zweiten Objektträger von der langen freien Fläche des ersten Objektträgers an den Tropfen herangeführt. Das Blut verteilte sich durch die Kapillarkwirkung an der Objektträgerkante. Nun erfolgte der Ausstrich im 45° Winkel, gleichmäßig und zügig, ohne absetzen. Nach der Lufttrocknung wurden die Ausstriche jeweils gefärbt und im Lichtmikroskop untersucht. Zur Anwendung kamen die DiffQuik- und die Giemsa-Färbung.

Tabelle 2: Durchgeführte Färbungen bei den Blutausstrichen

Tiernummer	DiffQuik	Giemsa
Boa 1	ja	nein
Boa 2	ja	nein
Boa 3	ja	ja
Boa 4	ja	ja
Boa 5	ja	ja
Boa 6	ja	ja
Boa 7	ja	ja
Boa 8	ja	nein
Python 9	ja	nein
Python 10	ja	ja
Python 11	ja	nein
Python 12	ja	ja
Python 13	ja	ja
Python 14	ja	ja
Python 15	ja	nein
Python 16	ja	nein
Boa 17	ja	ja
Boa 18	ja	ja
Boa 19	ja	ja
Boa 20	ja	ja
Boa 21	ja	ja
Boa 22	ja	ja
Boa 23	ja	ja
Python 24	ja	ja
Boa 25	ja	ja
Boa 26	ja	ja

3.5 Hämatologie

Für die Zählung der Blutzellen kam heparinisiertes Blut zum Einsatz. Die Ermittlung der Leukozyten- und Erythrozytenzahlen erfolgte mittels Zählkammerverfahren. Dafür wurde das Blut in einer Erythrozytenmischpipette bis zur Marke 1 aufgezogen und anschließend mit einem Geflügelblutverdünner nach Natt und Herrick (1952) bis zur Markierung 101 aufgefüllt. Danach kam die Pipette für mindestens 10 min. auf einen Rüttler, damit sich die Komponenten gut vermischten und somit eine ausreichende Färbungsintensität erreicht wurde. Die ersten drei Tropfen konnten aus der Pipette verworfen werden. Anschließend erfolgte die Befüllung der Zählkammer nach Neubauer. Nach einer Absetzzeit von 30 Sekunden konnte die Auszählung beginnen. Mit dem 40er Objektiv wurden die Leukozyten in den vier großen Eckquadraten, die jeweils aus 16 kleineren Quadraten bestehen, ausgezählt. Die ermittelten Zahlen wurden mit dem Faktor 250 multipliziert, um die Zellzahl in Tausend pro Mikroliter zu erhalten. Die Erythrozytenzahl wurde durch das Auszählen von fünf Gruppenquadraten, bestehend aus je 16 Kleinquadraten, bestimmt. Diesen Wert multiplizierte man mit dem Faktor 5000. Somit kam man zu einer Erythrozytenkonzentration in Millionen pro Mikroliter.

Der Referenzbereich der Leukozyten liegt laut Frommeyer und Weinzierl (2008) bei 4000 – 10000/ μl , während die Werte der Erythrozyten zwischen 0,4 – 1,3 Mio./ μl liegen.

Zur Plasmagewinnung wurde ein Teil des Blutes bei 10000 Umdrehungen pro Minute zweimal für 120 Sekunden zentrifugiert und das so gewonnene Plasma für die Paramyxovirusbestimmung abpipettiert. Das Plasma kam jeweils in kleine Plastikröhrchen, welche an ein Fremdlabor versandt und dort nach Standardverfahren untersucht wurden. Durch einen Hämagglutinationshemmungstest konnte der Paramyxovirus-Antikörpertiter der Schlangen ermittelt werden. Dabei wird die hämagglutinierende Wirkung des Paramyxovirus durch evtl. vorhandene spezifische Antikörper aus dem Schlangenplasma gehemmt, was auf ein positives Ergebnis hindeutet. Ein Plasma wird als positiv bewertet, wenn der ermittelte Antikörpertiter 1:16 oder höher ist. Darunter liegende Titer werden als fraglich beurteilt. Die Untersuchung konnte nur bei 6 Tieren durchgeführt werden (3 Boas und 3 Pythons).

3.6 Leberbiopsie

Die Leberbiopsie wurde unter Allgemeinnarkose durchgeführt. Die Narkoseeinleitung erfolgte durch Direktintubation. Die Tubusgröße richtete sich dabei nach der Größe der Trachea. Mittels des Inhalationsanästhetikums Isofluran cp® (Firma cp-pharma®, Burgdorf) wurde die Narkose eingeleitet und aufrechterhalten. Während der Narkosedauer wurden die Tiere 1-3 Mal pro Minute mit dem Isofluran-Sauerstoff-Gemisch beatmet. Zum Einsatz kam ein offenes Narkosesystem (Stephens Anaesthetic Apparatus, Firma Cenvet, Australien, Seriennummer: D1151 und Firma Eickemeyer, Tuttlingen). Sobald die Schlange das Narkosetoleranzstadium erreichte, wurde mit einem Ultraschallgerät der Firma Siemens AG, Typ Sonoline SI-250 und einem Linearschallkopf bei 7,5 MHz (Firma Siemens AG) die Leber auf der rechten Körperseite kaudal des Herzens ermittelt. Dabei lag das Tier in eine leicht linksseitigen Position, so dass der Bereich des Schuppenübergangs zwischen Seitenwand und Bauch gut zugänglich war. Nachdem eine geeignete Biopsiestelle der Leber gefunden wurde, desinfizierte man die Haut mit Kodan® (Firma Schülke & Mayr, Norderstedt). Anschließend erfolgte die Eröffnung der Coelomhöhle zwei schuppenbreit über den Bauchschuppen mit einem ca. 3-4 cm langen Skalpellschnitt in der Haut. Des Weiteren wurde stumpf in die Tiefe präpariert. Die Leber fixierte man mit den Fingern und z. T. wurden 1-3 Biopsieversuche mittels einer Biopsienadel (Biopsie-Kanüle, Firma Dispomed® Witt oHG, Gelnhausen, Typ 18 G 1,2 x 114 mm bzw. Temno Evolution™, Firma Cadinal Health, USA, Typ 18 G x 11 cm) unternommen. Zusätzlich erfolgte meist auch eine Keilexzision mittels Skalpell und/oder Schere (Tab. 20). Die Biopate wurden unmittelbar nach Entnahme in 4-5 % ige, neutralgepuffertes Formalin eingelegt. Im Anschluss an die Biopsie erfolgte der Verschluss der Körperhöhle und der Haut. Dies gelang mit einer Leberkapselnaht und Einzelheft(en), durch eine fortlaufende Coelom- und Muskelnah und mit einer U-Naht an der Haut (resorbierbares Nahtmaterial: Chirlac EP3-USP 2/0, 1 x 70 cm, Firma Chirmax, Prag). Die Schlangen bekamen einen Wundsprayverband: Chloramphenicol-Pumpspray (Firma WDT, Garbsen) und St. Benedikt Sprühpflaster (Firma ProDimiPharma, Dortmund). Des Weiteren bekamen alle Tiere ein Analgetikum (0,01 ml Flunixin-Meglumin/100 g Körpergewicht, Finadyne® 1 %, Firma Essex Tierarzney), 0,1 ml/100g Körpergewicht bzw. max. 2 ml pro Tier Hepavet® (Firma Biokanol Pharma GmbH) zur Leberunterstützung, eine Infusion (1 ml NaCl 0,9 % - Lösung/100 g Körpergewicht, Firma Berlin-Chemie AG) und ein Antibiotikum (0,01 ml Marbofloxacin/100 g Körpergewicht, Marboxyl® 2 %, Firma Vetoquinol GmbH, Ravensburg) jeweils subkutan injiziert. Bis die Tiere wieder bei vollständigem Bewusstsein

waren, standen sie unter ständiger Beobachtung und wurden bei Bedarf mit einem Beatmungsbeutel beatmet. Anschließend wurden sie in ihre Terrarien zurück gebracht.

3.7 Sektion

Bei 12 Tieren wurde eine komplette Sektion durchgeführt. Davon waren 5 Sektionen zusätzlich zur Leberbiopsie, während bei 7 Tieren nur eine Sektion gemacht werden konnte. Die Schlangen wurden mit dem Barbiturat enthaltendem Nacoren® (Firma Pfizer GmbH Tiergesundheit, Berlin) intrakardial euthanasiert und i.d.R. im Anschluß sezziert. Teilweise lagerten die Schlangen auch bis zur Sektion bei minus 20 °C.

Alle Organsysteme wurden auf makroskopische Veränderungen hin untersucht und Proben von sämtlichen Organen für die histopathologische Untersuchung entnommen. Von Leber, Niere, Pankreas und Milz ausgewählter Tiere entnahm man zusätzlich Proben für die elektronenmikroskopische Untersuchung. Außerdem wurde z. T. eine parasitologische Untersuchung anhand eines Darmabstriches durchgeführt.

Tabelle 3: Überblick über die durchgeführten Leberbiopsien bzw. Sektionen bei den Schlangen

Tiernummer	Leberbiopsie	Sektion
Boa 1	nein	ja
Boa 2	nein	ja
Boa 3	ja	ja
Boa 4	ja	ja
Boa 5	ja	nein
Boa 6	ja	nein
Boa 7	ja	ja
Boa 8	ja	nein
Python 9	ja	ja
Python 10	ja	nein
Python 11	ja	nein
Python 12	ja	nein
Python 13	ja	nein
Python 14	ja	nein
Python 15	nein	ja
Python 16	nein	ja
Boa 17	ja	ja
Boa 18	ja	nein
Boa 19	ja	nein
Boa 20	ja	nein
Boa 21	ja	nein
Boa 22	ja	nein
Boa 23	ja	nein
Python 24	nein	ja
Boa 25	nein	ja
Boa 26	nein	ja

3.8 Vorbereitungen für die histologische Untersuchung

Die Leber- bzw. Organstücke wurden ca. 24 Stunden in 4-5 % igem, neutralgepuffertem Formalin fixiert und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Dies geschah in einem Entwässerungsautomat Tissue-Tek® V.I.P der Firma Sakura Bayer Diagnostics für 10-12 Stunden. Danach fand die Paraffineinbettung des Probenmaterials statt. An einem Mikrotom der Firma Reichert-Jung®, Modell 1140/ Autocut wurden 4 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Diese kamen zur Trocknung für ca. 12 Stunden bei 60 °C in den Trockenschrank B 6 der Firma Heraeus. Im Anschluss daran erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE), z. T. auch mit Giemsa bzw. PAS. Nach Eindeckung mit Xylol und Eukitt® (O. Kindler GmbH, Freiburg) und Trocknung der Schnitte bei 60 °C für mindestens 12 Stunden konnten die Präparate im Lichtmikroskop der Firma Zeiss® beurteilt und u. U. fotografiert (moticom 2000, Firma Motic®) werden.

Tabelle 4: Durchgeführte Färbungen bei den histologischen Präparaten

Tiernummer	HE	Giemsa	PAS
Boa 1	ja	ja	ja
Boa 2	ja	ja	ja
Boa 3	ja	ja	ja
Boa 4	ja	ja	ja
Boa 5	ja	ja	ja
Boa 6	ja	nein	nein
Boa 7	ja	nein	nein
Boa 8	ja	ja	ja
Python 9	ja	nein	nein
Python 10	ja	ja	ja
Python 11	ja	ja	ja
Python 12	ja	ja	ja
Python 13	ja	ja	ja
Python 14	ja	ja	ja
Python 15	ja	nein	nein
Python 16	ja	ja	nein
Boa 17	ja	nein	nein
Boa 18	ja	nein	nein
Boa 19	ja	nein	nein
Boa 20	ja	nein	nein
Boa 21	ja	nein	nein
Boa 22	ja	nein	nein
Boa 23	ja	nein	nein
Python 24	ja	nein	nein
Boa 25	ja	nein	nein
Boa 26	ja	nein	nein

3.9 Probenaufbereitung für die Elektronenmikroskopie

Zur näheren Untersuchung und Bestätigung der im Lichtmikroskop erlangten Ergebnisse wurden ausgewählte Organstücke für die Elektronenmikroskopie vorbereitet: Leber, z. T. auch Pankreas, Milz und Niere. Dafür wurden die Organproben in kleine Stücke mit einer jeweiligen Kantenlänge von ca. 1 mm zerteilt und in eine 6,25 % ige Glutaraldehydlösung (Stammlösung 25 %, Firma Merck, Darmstadt) für ungefähr 12 Stunden im Kühlschrank bei 4-6 °C eingelegt. Danach wurde eine dreimalige Waschung mit einer Sörensen-Saccharose-Pufferlösung (pH 7,4) durchgeführt. Bis zur weiteren Bearbeitung verweilten die Probenstücke in der Pufferlösung im Kühlschrank (4-6 °C).

Die Gewebestückchen wurden aus dem Puffer genommen und für zwei Stunden in Osmiumtetroxid-Lösung (2 %) nach Caulfield zur Nachfixierung gegeben. Im Anschluss daran spülte man die Stücke wieder dreimal mit der Saccharose-Pufferlösung nach Sörensen. Danach fand die Dehydrierung der Proben in unterschiedlichen Acetonmischungen statt: für 20 min in 75 % igem Aceton, für 20 min in 95 % igem Aceton, 3 x für je 20 min in absolutem Aceton und jeweils 10 min in aufsteigenden Aceton-Epon Gemischen (3:1, 1:1, 1:3). Nun folgte die Einbettung der Organstückchen in reinem Epon XX 812 (Firma Sigma) in Gelatinekapseln. Zur Auspolymerisation wurden die Kapseln für 2-4 Tage in den Trockenschrank (60 °C) gestellt. Um die Gelatinekapseln danach abzulösen, wurden diese in heißes Wasser gegeben. Die befreiten Eponblöcke kamen dann nochmals über Nacht in den Trockenschrank und wurden anschließend auf einer Mikrofräse TM 60 der Firma Reichert-Jung® zugetrimmt. Am Ultramikrotom Ultracut der Firma Reichert-Jung® wurden 0,35 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt, die nach Trocknung auf den Objektträgern für 5 min bei 180 °C auf einer Heizplatte H 22 electronic (Firma Gebhardt, Bonn) hitzefixiert wurden. Nach Abkühlung erfolgte die Färbung mit einer Toluidinblau-Lösung (Firma Merck, Darmstadt) ebenfalls auf der Heizplatte bei 70 °C für ca. 10 min. Danach wurde die Lösung mit Aqua dest. abgespült, luftgetrocknet und dann mit Eukitt® (ohne Xylol) und Deckglas eingedeckt. Nach erfolgter Trocknung konnten die Präparate unter dem Lichtmikroskop beurteilt werden. Geeignete Präparate wurden ausgewählt und nochmals an der Mikrofräse bearbeitet und weiter zugeschnitten, um dann am Ultracut der Firma Reichert-Jung® Ultradünnschnitte (70 nm) anzufertigen. Dabei kam ein Diamantmesser zum Einsatz. Die Ultradünnschnitte wurden auf Kupferträgernetze aufgezogen und kontrastiert: 5 min mit Uranylacetat und 2 min mit Bleicitrat (Firma Merck, Darmstadt). Danach wurden die Proben jeweils in Aqua dest. geschwenkt und mit Filterpapier abgetupft. Zum Schluss wurden die Präparate für ca. 24

Stunden in den Exsikkator zur Trocknung gestellt. Nun konnten die Präparate im Transmissionselektronenmikroskop vom Typ EM 109 der Firma Zeiss® bei 50 bzw. 80 kV beurteilt werden. Bilder wurden in unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen.

Tabelle 5: Proben für die elektronenmikroskopische Untersuchung von folgenden Tieren

Tiernummer	Organe
Boa 3	Leber, Niere, Pankreas, Milz
Boa 4	Leber, Niere, Pankreas, Milz
Boa 5	Leber
Python 12	Leber
Python 13	Leber

3.10 Kunststoffeinbettung und Schnitthanfertigung

(Hermanns et al. 1981)

Die in Formalin fixierten Proben wurden in eine Spülflüssigkeit gegeben.

Diese Autotechnikenspüllösung setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Cacodylatpuffer (0,1 M), bestehend aus 16,5 g Dimethylarsinsäure-Natriumsalz-Trihydrat (Firma Applichem, Darmstadt), 6,23 ml 1 N Salzsäure (Firma Applichem, Darmstadt) und 1500 ml Aqua dest. (80 °C). Der pH-Wert muss auf 7,2 eingestellt werden (s. unten).

Anschließende Zugabe von:

- 105 g Saccharose (Firma Applichem, Darmstadt)
- 1,105 g Kalziumchlorid-Dihydrat (Firma Merck, Darmstadt)

Alles muss gründlich durchmischt werden. Dann wird der pH-Wert erneut auf einen Wert von 7,2 mit 0,1 N HCl (Firma Merck, Darmstadt) bzw. mit 0,1 N NaOH (Firma Applichem, Darmstadt) eingestellt.

Danach kamen die Proben in einen Einbettungsautomaten (Citadel 1000, Shandon GmbH, Frankfurt) und wurden mit folgenden Arbeitsschritten entwässert:

- 2 x 1 h mit 30 % igem Äthanol
- 2 x 1 h mit 50 % igem Äthanol
- 2 x 2 h mit 70 % igem Äthanol
- 1 x 2 h mit 96 % igem Äthanol
- 2 x 3 h mit 96 % igem Äthanol

Nach der Entwässerung wurden die Proben 24 Stunden bei 4 °C auf einen Taumler (Modell 4010, Köttermann, Häningsen) in ein 1:1 Kunststoffgemisch aus Methacrylsäure-2-hydroxyester (GMA) und Methacrylsäuremethylester (MMA) gebracht und mindestens 4 Stunden bei Raumtemperatur in dem Einbettungsmedium (Lösung A) inkubiert.

Lösung A setzt sich wie folgt zusammen:

- 60 ml Methacrylsäure-2-hydroxyethylester (GMA, Fluka, Buchs, Schweiz)
- 20 ml Methacrylsäuremethylester (MMA, Fluka, Buchs, Schweiz)
- 16 ml Ethylenglykolmonobutylether (Firma Merck, Darmstadt)
- 2 ml Polyäthylenglykol 400 (Firma Merck, Darmstadt)
- 338 mg Benzoylperoxid (Firma Merck, Darmstadt)

Der pH-Wert der Lösung wird auf einen Wert von 5,0 mit 0,1 N HCl (Merck, Darmstadt) oder mit 0,1 N NaOH (Merck, Darmstadt) eingestellt.

Anschließend kamen die Proben für die Polymerisation in ein anderes Einbettungsmedium (Lösung B, s. unten) und wurden in Polyäthylen-Probenbehälter (LDPE mit Schnappdeckel, Diagonal, Münster) luftdicht verschlossen.

Die Lösung B wurde folgendermaßen hergestellt: Zu 40 ml Lösung A werden 60 µl N-N-Dimethylanilin (Firma Merck, Darmstadt) frisch dazugegeben, welches als Starter fungiert und durch den die Polymerisation des Mediums induziert wird.

Die ausgehärteten und abgekühlten Kunststoffblöcke wurden dann am Hartschnittmikrotom (HM 360, Mikrom, Walldorf) geschnitten und die Schnitte auf Objektträger aufgezogen und gefärbt.

3.11 Färbeprotokolle für Blutausstriche

Es wurde jeweils nach den Protokollen der Klinik für Fische und Reptilien der Tierärztlichen Fakultät der LMU München vorgegangen.

3.11.1 Diff-Quik® (Modifizierte Pappenheimfärbung)

Die Blutausstriche wurden wie folgt in der Diff-Quik® Schnellfärbung der Firma Medion Diagnostics AG, Schweiz gefärbt:

- 10-15 x kurzes Eintauchen in die jeweiligen Fertiglösungen:
Fixierlösung
Färbelösung I mit Eosin Y
Färbelösung II mit Thiazin
- Danach mit Aqua dest. abspülen
- Ca. 1 Stunde lufttrocknen lassen
- Mit Xylol eindecken
- Über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C inkubieren

3.11.2 Giemsa

Bei dieser Färbung der Blutausstriche wurde folgendermaßen vorgegangen:

- 10-15 mal in der Fixierlösung der Diff-Quik® Färbung schwenken
- 45 min. in der Giemsa-Gebrauchslösung (s. unten) bei 60 °C im Trockenschrank eingetaucht lassen
- Spülen mit Aqua dest.
- Ca. 1 Stunde Lufttrocknung
- Verbringen in Xylol
- Eindecken mit Eukitt®
- Über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C inkubieren

3.12 Färbeprotokolle für Paraffinschnitte

Dabei wurde jeweils nach den Protokollen der Klinik für Fische und Reptilien der Tierärztlichen Fakultät der LMU München vorgegangen.

3.12.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)

Die Färbelösung setzte sich aus den Komponenten Eosin G (Firma Merck, Darmstadt), Eisessig (Firma Merck, Darmstadt) und saure Mayers Hämalaun-Lösung (Firma Applichem, Darmstadt) zusammen. Die getrockneten Paraffinschnitte wurden wie folgt gefärbt:

- Je 10 min. in Xylol I und II zum Entparaffinieren
- 5 min. Isopropylalkohol
- Je 5 min. in absteigende Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %)
- Kurz in Aqua dest. eintauchen
- 4 min. in Mayers Hämalaun
- Gründlich in Aqua dest. spülen
- 4 min. wässern unter fließendem Leitungswasser
- 20 min. in Eosin
- Spülen in Aqua dest.
- Kurz in Küvetten mit aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %) eintauchen
- 5 min. Isopropylalkohol
- Je 10 min. in Xylol I und II
- Eindecken mit Eukitt®
- Nochmals über Nacht im Trockenschrank inkubieren

3.12.2 Giemsa

Für die Giemsa-Färbung der Paraffinschnitte wurde die Giemsa-Stammlösung 25 % (Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung) der Firma Merck, Darmstadt 1:4 mit Aqua dest. verdünnt. Folgende Schritte wurden unternommen:

- Je 10 min. in Xylol I und II zum Entparaffinieren
- 5 min. Isopropylalkohol
- Je 5 min. in absteigende Alkoholreihe (96 %, 80 %, 70 %)
- Kurz in Aqua dest. eintauchen
- 1 Stunde in der Giemsa-Lösung im Trockenschrank inkubieren
- Gründlich in Aqua dest. spülen
- Kurz in Küvetten mit aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %) eintauchen
- 5 min. Isopropylalkohol
- Je 10 min. in Xylol I und II
- Eindecken mit Eukitt®
- Nochmals über Nacht im Trockenschrank inkubieren

3.12.3 PAS (Periodic-Acid Schiff Reaktion)

Dafür wurden die Reagenzien der Firma Sigma-Aldrich, Steinheim genutzt. Bei der PAS-Reaktion wurden die Paraffinschnitte wie folgt behandelt:

- 5 min. in 1 % ige Perjodsäure bei Raumtemperatur (Oxidation von 1,2 Glykolen durch Perjodsäure)
- 5 min. spülen in 70 % igem Alkohol
- 2 Stunden im Schiff'schen Reagenz bei Raumtemperatur stehen lassen
- 3 x 10 min. in Sulfitwasser
- 3 x waschen in 70 % igem Alkohol
- 1-2 x in Aqua dest. spülen
- 5 min. Kerne anfärben in Mayers Hämalaun
- Mehrmals eintauchen in Küvetten mit aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %)
- Verbringen in Xylol
- Eindecken mit Eukitt®
- Nochmals über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C inkubieren

3.13 Färbeprotokoll für Semidünnschnitte

3.13.1 Toluidinblau

Verwendet wurde eine 0,1 % ige Toluidinblau-Lösung nach Trump (1961). Vor Anwendung musste die fast gesättigte Lösung filtriert werden, da es zur Ausflockung kommen kann. Eine Färbung ist möglich, ohne das Einbettungsmittel (Epon) entfernen zu müssen.

Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

- Schnitte auf Heizplatte bei 70 °C für ca. 10 min.
- Die Lösung mit Aqua dest. abspülen
- Lufttrocknung
- Mit Eukitt® (ohne Xylol) und Deckglas eingedecken
- Über Nacht im Trockenschrank bei 60 °C inkubieren

3.14 Färbeprotokolle für Kunststoffschnitte

Die Schnitte wurden nach der Hämatoxylin-Eosin-Phloxin-Methode gefärbt:

- 5 min. in Hämalau sauer, nach Mayer (Merck, Darmstadt)
- 10 min. wässern in fließendem Leitungswasser
- Kurzes Differenzieren in 1 % igem HCl-Äthanol (s. unten)
- 10 min. wässern in fließendem Leitungswasser
- Trocknen der Schnitte auf der Heizplatte (OTS 40, Medite Medizintechnik, Burgdorf)
- 20 min. Färben der Schnitte in der Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung (s. unten)
- Zweimaliges Spülen in Aqua dest.
- Trocknen der Schnitte auf der Heizplatte
- Verbringen in Xylol
- Eindecken

HCl-Äthanol (1 %):

- 10 ml 25 % ige Salzsäure (Firma Applichem, Darmstadt)
- 700 ml 96 % iges Äthanol
- 250 ml Aqua dest.

Eosin-Phloxin-Gebrauchslösung:

- 468 ml 96 % iges Äthanol
- 30 ml Stammlösung Eosin (SE): 1,0 g Eosin gelblich (Firma Applichem, Darmstadt) und 1000 ml Aqua dest.
- 3 ml Stammlösung Phloxin (SP): 1,0 g Phloxin (Firma Merck, Darmstadt) und 1000 ml Aqua dest.
- 2,4 ml 96 % ige Essigsäure

3.15 Darstellung der Farbkomponenten

(Romeis 1989)

3.15.1 DiffQuik

Die Ergebnisse der Färbung sind mit denen der Pappenheim-Methode (kombinierte Giemsa-May-Grünwald-Färbung) gut vergleichbar:

Tabelle 6: Färbeargebnisse bei den Blutausstrichpräparaten

Zellkerne	rotviolett
Erythrozytenplasma	blassrosa
Lymphozyten-Zytoplasma	hellblau bzw. helllila
Monozyten-Zytoplasma	grau-blau
Thrombozyten-Zytoplasma	weiß
Heterophilen-Granula	rot
Eosinophilen-Granula	orange/ ziegelrot
Basophilen-Granula	dunkelviolettschwarz

3.15.2 Giemsa

Tabelle 7: Färbeergebnisse bei den Blutausstrichpräparaten

Zellkerne	blau
Erythrozytenplasma	blassrosa
Lymphozyten-Zytoplasma	helllila- blau
Monozyten-Zytoplasma	grau-blau
Thrombozyten-Zytoplasma	weiß bzw. hellblau
Heterophilen-Granula	rot(braun)
Eosinophilen-Granula	rotbraun
Basophilen-Granula	dunkelblau/ violettblau

Tabelle 8: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten

Parenchym	heller blau
Zellkerne	blau
Erythrozytenplasma	rot
Lymphozyten	blau
Heterophilen-Granula	rot

3.15.3 Hämatoxylin-Eosin (HE)

Tabelle 9: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten

Kollagenfasern, Muskulatur	rot
Bindegewebe	rosa
Zellkerne	blau
Erythrozytenplasma	rot
Lymphozyten	blau
Heterophilen-Granula	rot

3.15.4 PAS (Periodic-Acid Schiff Reaktion)

PAS-positive Substanzen färben sich je nach Menge rosa bis purpurrot oder violett.

Genutzt wird diese Färbung zum Nachweis von Glykogen (z. B. in Leber- oder Muskelzellen), neutralen Mukosubstanzen (Oberflächendrüsen des Magens, Kolloid der Schilddrüse), Hyalin, Basalmembranen u. a.

Tabelle 10: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten

Zellkerne	blau
Zytoplasma	blassrosa
RNA-haltiges Zytoplasma	bläulicher
Hintergrund	zartrosa

3.15.5 Toluidinblau

Mit dieser Lösung werden alle Strukturen angefärbt, die als basophil bekannt sind. Das Bild ist von kräftigen Blautönen geprägt und ähnelt der elektronenmikroskopischen Abbildung. Dabei entspricht die unterschiedliche Blautönung der relativen Elektronendichte des untersuchten Materials.

Tabelle 11: Färbeergebnisse bei den histologischen Präparaten

Zellkern	dunkelblau
Zytoplasma	blau (orthochromatisch)
Gewebe	blau
Bindegewebe	rosa bis rot (metachromatisch)

3.16 Statistik

Für die statistische Auswertung einiger Daten kamen folgende Tests zum Einsatz: der Chi-Quadrat Test, der mit dem Programm Statcalc (EpiInfo, 2008) berechnet wurde, das *kappa*-Übereinstimmungsmaß und das 95 % Konfidenzintervall KI. Die beiden letzteren wurden mit Excel (Microsoft) ermittelt. Das Konfidenzintervall gibt die Werte für die Prävalenz wieder. Der p-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit) trifft eine Aussage darüber, ob Unterschiede auf Zufall beruhen oder nicht. P-Werte von $> 0,05$ gelten als nicht signifikant, Werte von $p \leq 0,05$ als signifikant.

4 Ergebnisse

4.1 Tiere

Die insgesamt 26 Riesenschlangen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, nämlich 17 Boas und 9 Pythons (Tab. 12). Von den 17 untersuchten Boas (10 *Boa constrictor constrictor* und 7 *Boa constrictor imperator*) sind 13 positiv und 4 negativ für IBD beurteilt worden, d. h. es wurden in den Blutaussstrichen und/oder im Gewebe die jeweils typischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen gefunden bzw. nicht gefunden. In dieser Gruppe waren 7 männlich (davon eine negativ), 9 weiblich (davon 3 negativ) und ein positives Tier mit nicht bekanntem Geschlecht vertreten. Wenn man innerhalb der Art nochmals zwischen positiv und negativ unterschied, fiel auf, dass von den 10 *Boa constrictor constrictor* 3 Tiere negativ waren (2 Weibchen, ein Männchen). Ein negatives Tier (Weibchen) gab es bei den 7 *Boa constrictor imperator*. Das heißt also, es gab 7 IBD positive *Boa constrictor constrictor* und 6 positive *Boa constrictor imperator*.

Die untersuchte Pythongruppe setzte sich aus insgesamt 9 Tieren zusammen, von denen 6 männlich und 3 unbekanntes Geschlechts waren. Folgende Arten waren vertreten: 3 Tigerpythons (*Python molurus molurus*) (2 männlich, 1 unbekanntes Geschlecht), 5 Königspythons (*Python regius*) (3 männlich, 2 unbekanntes Geschlechts) und eine männliche Teppichpython (*Morelia spilota variegata*). Es gab 2 IBD positive Männchen (Einschlusskörper in Blutaussstrich und/oder in den Sektionspräparaten) und 7 IBD negativ diagnostizierte Exemplare. Bei den Pythonarten ergaben sich folgende Ergebnisse: alle 3 Tigerpythons wurden negativ für IBD getestet, genauso wie die Teppichpython. Bei den Königspythons ergab sich ein Verhältnis positiv zu negativ von 2:3, wobei beide positiven Königspythons männlich waren.

Mit diesen Daten ergibt sich eine Prävalenz von 76,47 % bei den Boas (13 positive von 17) mit 95 % Konfidenzintervall KI: 52,7 - 90,6 %. Bei den Pythons (2 positive von 9) ergibt sich eine Prävalenz von 22,22 % mit 95 % Konfidenzintervall KI: 6,32 - 54,74 %, das angesichts der geringen Tierzahl relativ niedrig ausfällt.

Nachfolgend wird in Abbildung 3 die Verteilung der an IBD erkrankten Schlangen grafisch dargestellt.

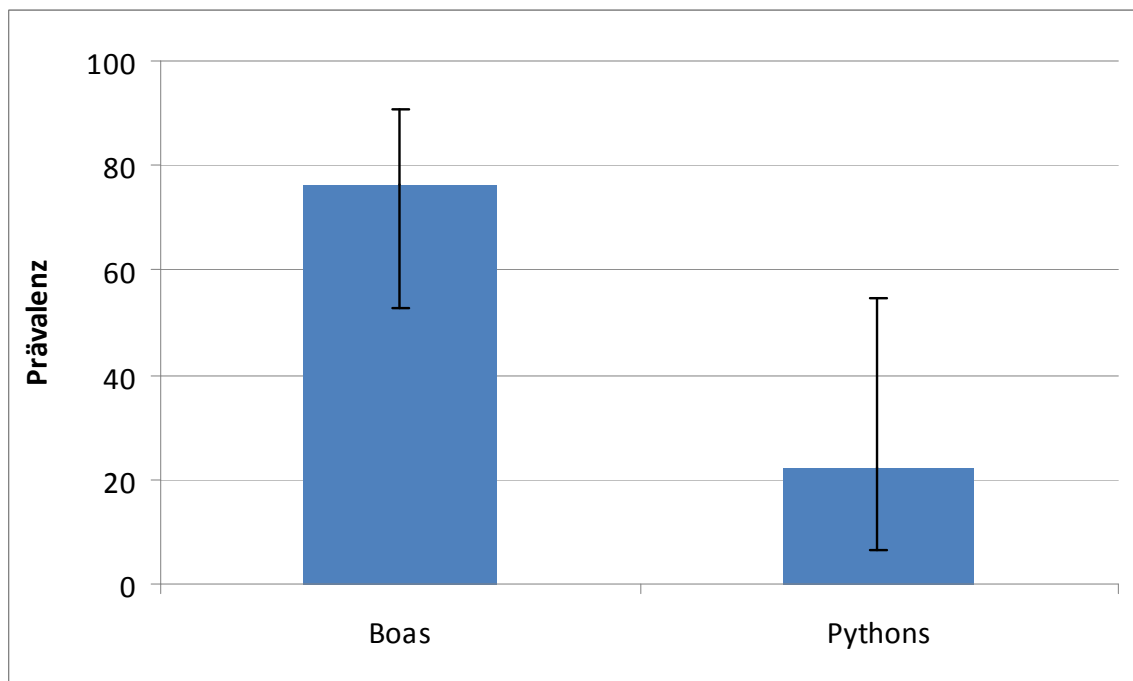


Abbildung 3: Prävalenz von IBD bei Boas (n=17) und Pythons (n=9) mit 95 % Konfidenzintervall

Tabelle 12: Überblick über die Verteilung der positiven und negativen Tiere

Nummer	Art	Geschlecht	positiv (+)/negativ(-)
1	Abgottschlange	0,1	+
2	Abgottschlange	0	+
3	Kaiserboa	0,1	+
4	Kaiserboa	1	+
5	Abgottschlange	0,1	+
6	Abgottschlange	1	+
7	Abgottschlange	0,1	-
8	Kaiserboa	0,1	-
9	Teppichpython	1	-
10	Königspython	0	-
11	Königspython	0	-
12	Tigerpython	1	-
13	Tigerpython	1	-
14	Tigerpython	0	-
15	Königspython	1	+
16	Königspython	1	+
17	Kaiserboa	0,1	+
18	Kaiserboa	1	+
19	Abgottschlange	1	+
20	Abgottschlange	0,1	+
21	Abgottschlange	1	+
22	Abgottschlange	1	-
23	Abgottschlange	0,1	-
24	Königspython	1	-
25	Kaiserboa	0,1	+
26	Kaiserboa	1	+

Abgottschlange (*Boa constrictor constrictor*); Kaiserboa (Kolumbien) (*Boa constrictor imperator*); Tigerpython (*Python molurus*); Königspython (*Python regius*); Teppichpython (*Python spilotus variegata*); Geschlecht: 1 = männlich; 0,1 = weiblich; 0 = keine Angaben

4.2 Klinische Allgemeinuntersuchung

Insgesamt zeigten sich nur relativ unspezifische Symptome, welche in unterschiedlicher Häufigkeit bzw. Verteilung auftraten (Tab. 13 und 14). Dabei wurden 22 Tiere als klinisch auffällig beurteilt.

Folgende Symptome fielen bei den positiven Boas auf: chronische Regurgitation, Inappetenz, reduzierter Ernährungszustand, Dehydratation, Dysecdysis, ZNS-Störungen, reduzierter Muskeltonus mit Bereichen tonisch-klonischer Spasmen, Atemwegsprobleme (Maulatmung, Pneumonie), ein reduziertes Allgemeinbefinden und Darmparasiten. Dabei ließen einige Symptome einen IBD Verdacht vermuten: Regurgitation, Häutungsprobleme, zentralnervöse Störungen und Atemwegsprobleme. Diese fielen bei 8 positiven Boas auf, allerdings in unterschiedlicher Verteilung. Zwei positive Tiere wiesen nur unspezifische Symptome wie Inappetenz, Apathie und Unterernährung auf. Drei IBD positive Boas zeigten keinerlei Symptomatik und befanden sich bei gutem Allgemeinbefinden. Bei den 4 negativen Schlangen konnten unspezifische (Inappetenz, Apathie) und für IBD verdächtige Symptome (ZNS-Störungen) festgestellt werden. Von den insgesamt 14 klinisch auffälligen Boas waren 10 Tieren als positiv diagnostiziert worden, während 4 Schlangen keinerlei Einschlüsse aufwiesen und negativ beurteilt wurden.

Bei einer positiven Python konnten Apathie, Häutungsstörungen, ein verzögerter Umkehrreflex, Atemwegsprobleme, Milben und Darmparasiten festgestellt werden, wobei die mittleren vier Symptome für IBD sprechen würden. Währenddessen die andere positive Python nur einen reduzierten Ernährungszustand aufwies und eine Verhaltensänderung (Aggressivität) zeigte. Eine sonst klinisch unauffällige, negativ beurteilte Python zeigte nur ein aggressives Verhalten. Bei einem negativen Tier konnten nur unspezifische Auffälligkeiten wie Inappetenz und Unterernährung festgestellt werden, während die verbliebenen 5 negativen Pythons mehr oder weniger IBD verdächtige klinische Erscheinungen hatten. Von diesen zeigten 2 negative Pythons ZNS-Störungen und z. T. auch unspezifische Symptome (Inappetenz, einen reduzierten Ernährungszustand, Apathie). Eine Python war aggressiv und hatte einen Milbenbefall, während die andere unter einer Pneumonie litt. Die letzte der 5 negativen Pythons wies Häutungsstörungen auf. Von den insgesamt 8 klinisch auffälligen Pythons wurden 2 Tiere positiv und 6 negativ beurteilt.

Eine der 13 IBD positiven Boas zeigte chronische Regurgitation, was bei den Pythons nicht auftrat. Eine Dehydrierung konnte auch nur bei den Boas festgestellt werden (5 positive). Unter Inappetenz litten 6 positive und eine negative Boa, sowie 2 negative Pythons.

Kachektisch bzw. mager waren 6 positive Boas, sowie eine positive und 3 negative Pythons. Häutungsprobleme traten bei 5 positiven und einer negativen Boa, sowie zwei Pythons (eine positiv, eine negativ) auf. Stargazing (Sterngucken) zeigten 4 positive und eine negative Boa. Bei den Pythons konnte dies nicht beobachtet werden. Opisthotonus kam nur bei 2 negativen Boas vor. Koordinationsstörungen wiesen 2 positive Boas, sowie eine negative Boa und eine negative Python auf. Einen reduzierten Muskeltonus, sowie eine verspannte Muskulatur konnten nur bei 2 positiven Boas festgestellt werden. Der Umkehrreflex von 3 positiven Boas, einer negativen Boa und von je einer positiven und negativen Python war reduziert. Ein aggressives Verhalten legten je eine positive Boa (Nr. 6) und Python (Nr. 16) und drei negative Pythons (Nr. 9, 12, 13) an den Tag. Bei Python Nr. 12 war dies das einzige Symptom. Augenprobleme (Anisokorie, dilatierte Pupillen oder eine trübe Brille) konnten bei 5 Boas beobachtet werden, wobei 4 davon positiv waren. Bei den Pythons wies nur eine negative Python eine trübe Brille auf. Atemwegsprobleme (Pneumonie) kamen bei 3 positiven und einer negativen Boa, sowie bei einer positiven und 2 negativen Pythons vor. Insgesamt 7 Schlangen zeigten ein reduziertes Allgemeinbefinden, davon 4 positive Boas und eine positive Python, sowie je eine negative Boa und Python. Protozoen oder Flagellaten wurden bei 6 Tieren im Kot nachgewiesen: 3 positive Boas, eine positive und 2 negative Pythons. Ein Milbenbefall konnte nur bei 3 Pythons festgestellt werden, wovon eine positiv war.

Tabelle 13: Übersicht der aufgetretenen Symptome bei den Boas

Symptome	Boa 1	Boa 2	Boa 3	Boa 4	Boa 5	Boa 6	Boa 7	Boa 8	Boa 17	Boa 18	Boa 19	Boa 20	Boa 21	Boa 22	Boa 23	Boa 25	Boa 26	betroffene Tiere
Regurgitation	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	1
Inappetenz	ja	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	(ja)	(ja)	nein	nein	nein	nein	nein	7
EZ red.	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	6
Exsikkose	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	5
Dysecdysis	ja	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	(ja)	ja	nein	6
Stargazing	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	5
Opisthotonus	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	2
Koordinationsst.	ja	nein	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	3
Muskeltonus red./ verkrampft	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	2
Umkehrreflex verzögert	nein	nein	ja	nein	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	4
Verhaltensänderung	nein	nein	nein	nein	nein	agg.	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	1
Anisokorie	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	bds. dil.	3
IBD positiv	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja	ja	13

Fortsetzung der Tab. 13

Symptome	Boa 1	Boa 2	Boa 3	Boa 4	Boa 5	Boa 6	Boa 7	Boa 8	Boa 17	Boa 18	Boa 19	Boa 20	Boa 21	Boa 22	Boa 23	Boa 25	Boa 26	betroffene Tiere
trübe Brille	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	2
Pneumonie	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	4
Apathie	ja	ja	ja	nein	nein	nein	ja	nein	nein	nein	(ja)	nein	nein	nein	nein	nein	nein	5
Darmparasiten	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	3
Milben	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	0
IBD positiv	ja	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja	ja	ja	ja	ja	nein	nein	ja	ja	13

(ja) = teilweise vorhanden; red. = reduziert; st. = Störungen; EZ = Ernährungszustand; verz. = verzögert; bds. dil. = beidseits dilatiert; agg. = aggressiv

Eine Exsikkose oder eine Anisokorie wies keine der Pythons auf, und wurde deshalb in der folgenden Tabelle (Tab. 14) nicht aufgeführt.

Statistisch konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der klinischen Symptome zwischen positiven und negativen Tieren festgestellt werden ($p > 0,05$), weder bei den Boas noch bei den Pythons (Tabelle 13 und 14). Es besteht hier eine zu große Variabilität der klinischen Auffälligkeiten, so dass keine spezifische Zuordnung möglich ist.

Tabelle 14: Übersicht der aufgetretenen Symptome bei den Pythons

Symptome	Python 9	Python 10	Python 11	Python 12	Python 13	Python 14	Python 15	Python 16	Python 24	betroffene Tiere
Regurgitation	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	0
Inappetenz	ja	nein	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	2
EZ red.	nein	ja	ja	nein	nein	nein	nein	ja	ja	4
Dysecdysis	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	2
Stargazing	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	0
Opisthotonus	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	0
Koordinationsst.	ja	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	1
Muskeltonus red.	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	0
Umkehrreflex verz.	nein	ja	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	2
Verhaltensänderung	agg.	nein	nein	agg.	agg.	nein	nein	agg.	nein	4
trübe Brille	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	1
Pneumonie	ja	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	nein	3
Apathie	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein	2
Darmparasiten	ja	nein	nein	nein	nein	nein	ja	nein	ja	3
Milben	ja	nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	nein	3
IBD positiv	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja	nein	2

(ja) = teilweise vorhanden; red. = reduziert; st. = Störungen; EZ = Ernährungszustand; verz. = verzögert; bds. dil. = beidseits dilatiert;

agg. = aggressiv

4.3 Blutausstrich

Von jeder der 26 Schlangen wurden Blutausstriche angefertigt und mittels der DiffQuik-Färbung gefärbt. Zum Vergleich kam noch die Giemsa-Färbung bei 19 Blutausstrichen zum Einsatz (Tab. 2). Davon stammten 11 Blutausstriche von positiven Boas, 3 von negativen Boas und 5 von negativen Pythons. Von den 2 positiven Pythons standen keine Giemsa gefärbten Blutausstriche mehr zur Verfügung.

In allen DiffQuik gefärbten Ausstrichen der 13 IBD positiven Boas konnten Einschlusskörperchen in den Blutzellen gefunden werden, wobei das Vorkommen der Einschlüsse in den jeweiligen Zellen variierte: Einschlusskörper in den Erythrozyten kamen bei 10 positiven Boas vor. In den Thrombozyten waren bei 6 positiven Boas Einschlusskörperchen vorhanden und die Lymphozyten enthielten bei allen 13 positiven Boas Einschlüsse. Es konnte noch eine weitere Unterteilung vorgenommen werden: bei 5 Boas enthielten alle drei Blutzellarten Einschlüsse. Fünf andere Boas hatten sowohl in Erythrozyten als auch in Lymphozyten Einschlusskörperchen aufzuweisen. Bei einer Boa kamen Einschlüsse in Thrombozyten und Lymphozyten vor. Und bei zwei Boas konnten Einschlüsse nur in Lymphozyten gefunden werden. Zum Teil kamen die intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen nur vereinzelt in den jeweiligen Zellen vor (vgl. Tab. 15).

Von den beiden IBD positiven Pythons zeigte sich nur bei einer Python (Nr. 15) stark vereinzelt Einschlusskörperchen ausschließlich in den Erythrozyten. Weder in Lymphozyten noch in Thrombozyten konnten Einschlüsse gefunden werden. Die andere Python (Nr. 16) wies dagegen keinerlei Einschlüsse in den Blutzellen auf.

Die Ergebnisse bei den Giemsa gefärbten Ausstrichen decken sich weitestgehend mit denen der DiffQuik-Färbung, wobei sich manchmal die Anzahl der gefundenen Einschlüsse dahingehend unterschied, dass z. T. etwas weniger Einschlusskörperchen gefunden werden konnten. In sämtlichen Blutausstrichen der negativen Schlangen konnten keine intrazytoplasmatischen Einschlüsse festgestellt werden.

Auffälligkeiten stellten sich bei den heterophilen Granulozyten (kurz Heterophile genannt) dar. Während diese bei allen IBD positiven Boas kaum bzw. keine Granula mehr enthielten und zytotoxisch verändert waren, zeigten sie sich im Ausstrich der IBD positiven Pythons als intakte Heterophile mit Granula. Die negativen Boas wiesen alle physiologische Heterophile auf; teilweise enthielten sie zwar nur wenig Granula, waren aber nicht zytotoxisch verändert, hatten also intakte Zellmembranen und keine Vakuolen im Zytoplasma. Auch die negativen Pythons besaßen alle physiologische Heterophile.

Tabelle 15: Verteilung der Einschlusskörperchen (EK) in den verschiedenen Blutzellen im Blutaussstrich

Tiernummer	Erythrozyten	Thrombozyten	Lymphozyten
Boa 1	-	-	+
Boa 2	+/-	+	+
Boa 3	+	+	+
Boa 4	+/-	-	+
Boa 5	-	+/-	+
Boa 6	+	+	+
Python 15	+/-	-	-
Python 16	-	-	-
Boa 17	+/-	-	+/-
Boa 18	+/-	+/-	+
Boa 19	+	-	+
Boa 20	+/-	-	+
Boa 21	-	-	+/-
Boa 25	+	-	+/-
Boa 26	+	+/-	+

- = keine EK gefunden; +/- = vereinzelt EK vorhanden; + = EK vorhanden, z. T. deutlich

Beim Vorliegen von Einschlusskörperchen in den Erythrozyten wurde eine Prävalenz von 76,92 % bei den Boas (10 von 13) errechnet mit 95 % Konfidenzintervall KI: 49,74–91,82 %. Bei vorgefundenen Einschlüssen in den Thrombozyten ergab sich eine Prävalenz von 46,15 % bei den Boas (6 von 13) mit 95 % KI: 19,22–74,86 %. Für das Vorkommen von Einschlüssen in Lymphozyten wurde eine Prävalenz von 100 % bei den Boas (13 von 13) festgestellt mit 95 % KI: 77,19–100 %.

Die geschilderte Verteilung innerhalb der jeweiligen Blutzellen ist in Abbildung 4 grafisch dargestellt.

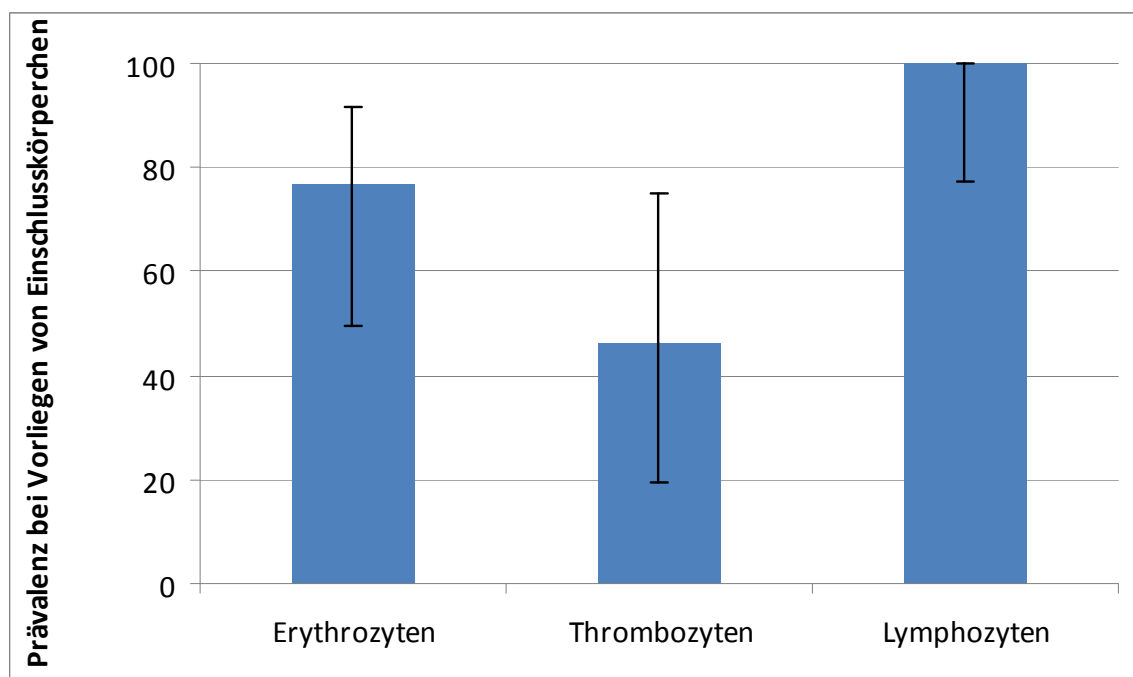


Abbildung 4: Prävalenz der Einschlüsse bei Boas (n=13) mit 95 % Konfidenzintervall in den verschiedenen Blutzellen.

4.3.1 Darstellung der Einschlusskörperchen

4.3.1.1 DiffQuik

Tabelle 16: Färbeergebnisse in den Blutausstrichen

Einschlusskörper in Erythrozyten	homogen gräulich/ graulila
Einschlusskörper in Thrombozyten	homogen gräulich/ graublau
Einschlusskörper in Lymphozyten	homogen lila/ bläulich

Im Folgenden sind lichtmikroskopische Aufnahmen von DiffQuik gefärbten Blutausstrichen IBD positiver Schlangen zu sehen, welche Einschlusskörperchen in den verschiedenen Blutzellen zeigen. Diese Einschlüsse stellen sich sowohl in den Erythrozyten, als auch in den Thrombozyten, als homogene, runde, gräuliche Strukturen im Zytoplasma der Zellen dar. In den Lymphozyten dagegen besitzen die intrazytoplasmatischen Einschlusskörper ein lila-bläuliches Aussehen und erscheinen teilweise polymorph in ihrer Gestalt.

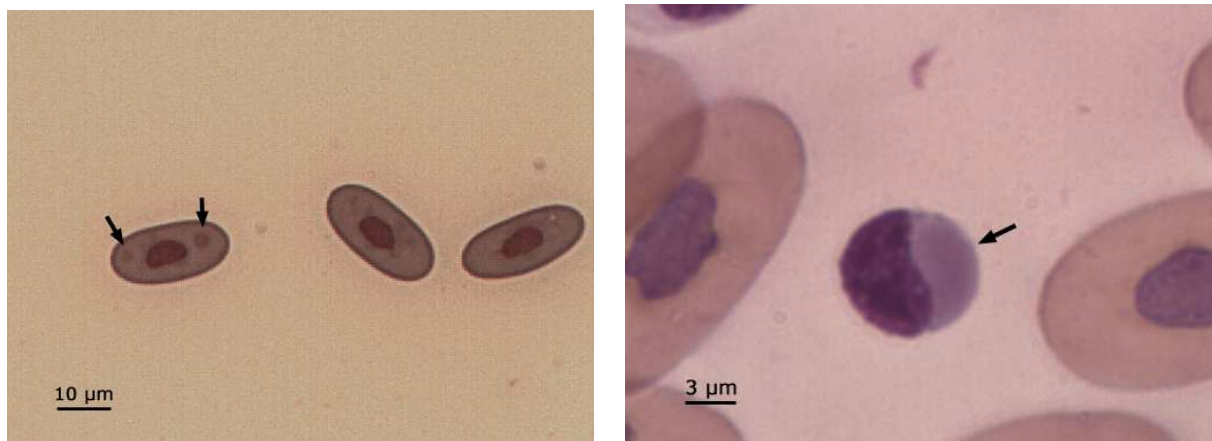


Abbildung 5: Dieser Blutausstrich stammt von einer IBD positiven *Boa constrictor imperator* (Nr. 2). Im linken Bild sind zwei homogen gräuliche, runde, intrazytoplasmatische Einschlusskörper in einem Erythrozyten (→) mit einem Durchmesser von ca. 2 µm bzw. 3,5 µm (DiffQuik, 400fache Vergrößerung) zu sehen. Das rechte Bild zeigt einen Lymphozyt mit einem homogenen, lila gefärbten Einschluss (→), dessen Durchmesser ungefähr 4,5 µm beträgt. Das Zytoplasma ist durch diesen - bis auf einen kleinen Rest oben - völlig verdrängt und der Zellkern ist eingedrückt (DiffQuik, 1000fache Vergrößerung).

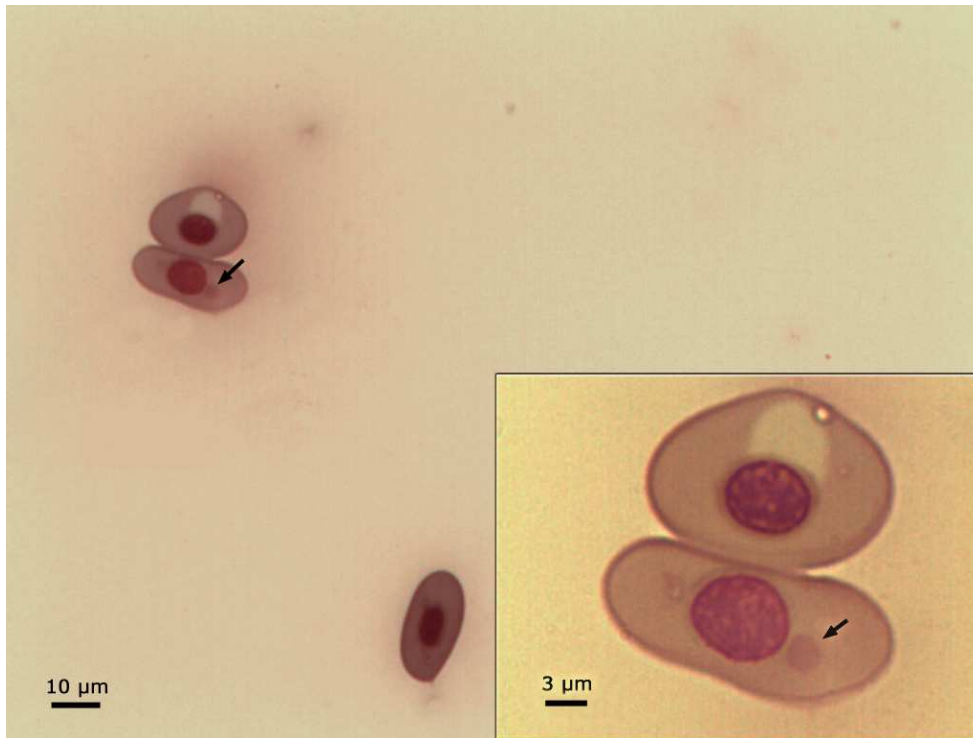


Abbildung 6: Dieser Blutausstrich stammt von einer IBD positiven männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 4) und zeigt einen homogenen, runden, gräulichen, intrazytoplasmatischen Einschlusskörper in einem Erythrozyten (→). Er weist einen Durchmesser von ca. 3 µm auf. Großes Bild: DiffQuik, 400fache Vergrößerung. Das kleine rechte Eckbild zeigt denselben Einschlusskörper in 1000facher Vergrößerung.

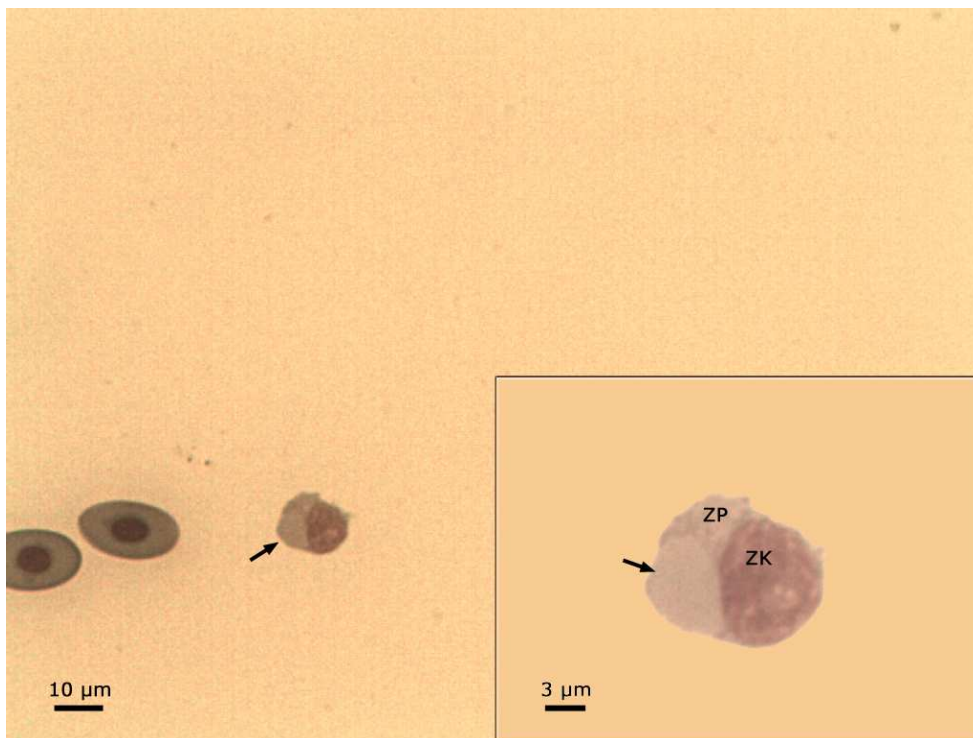


Abbildung 7: Der Blutausstrich stammt von derselben IBD positiven männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 4). In diesem Lymphozyt befindet sich ein Einschlusskörper (→), der sich homogen im Zytoplasma (ZP) des Lymphozyten darstellt. Der Zellkern (ZK) ist dadurch nur leicht eingedrückt. (DiffQuik, 400fache bzw. im Ausschnitt 1000fache Vergrößerung). Der Durchmesser des Einschlusses beträgt ca. 6 µm.

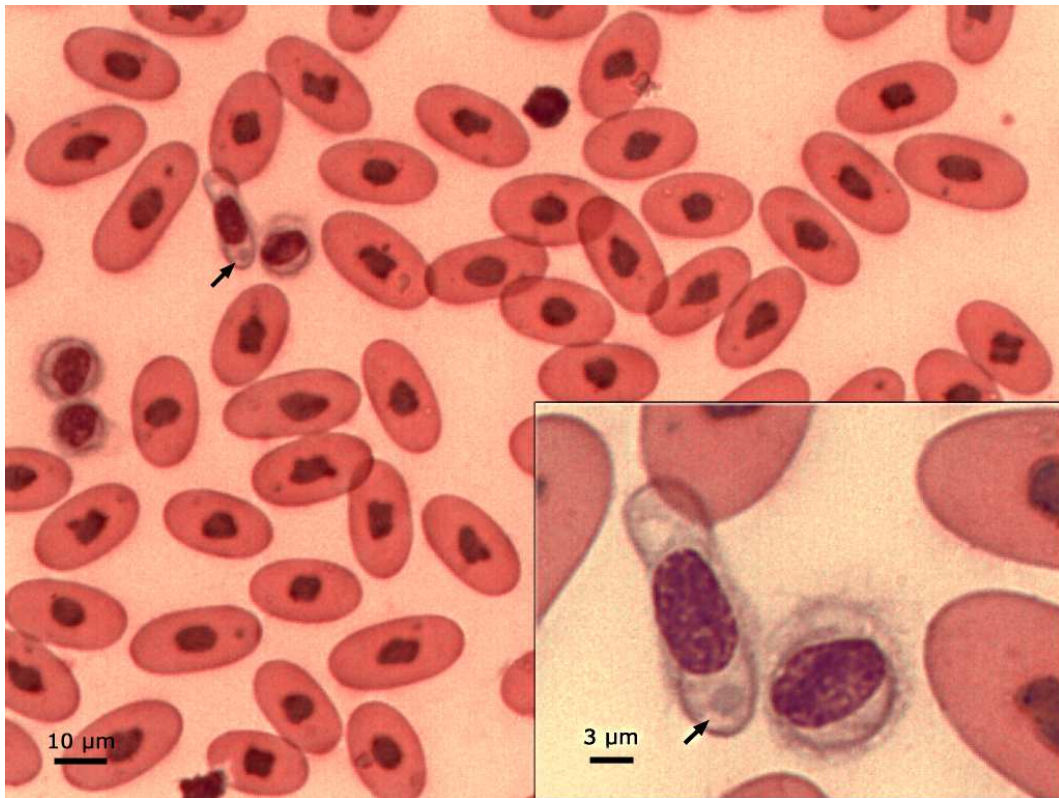


Abbildung 8: In dieser Abbildung ist ein Thrombozyt mit einem homogenen, runden, graublauen Einschlusskörper (→) mit einem ungefähren Durchmesser von 2,5 µm zu sehen (DiffQuik, 400fache Vergrößerung). Der Bildausschnitt zeigt diesen nochmals in 1000facher Vergrößerung. Der Ausstrich stammt von einer IBD positiven weiblichen *Boa constrictor* (Nr. 5).

4.3.1.2 Giemsa

Tabelle 17: Färbeergebnisse in den Blutausstrichen

Einschlusskörper in Erythrozyten	homogen weißlich-hellblau
Einschlusskörper in Thrombozyten	homogen blaugrau
Einschlusskörper in Lymphozyten	homogen weißlich-hellblau

Zum Vergleich werden nun lichtmikroskopische Aufnahmen von Giemsa gefärbten Blutausstrichen gezeigt. Die darin vorkommenden intrazytoplasmatischen Einschlüsse stellen sich in den Erythrozyten und Lymphozyten als sehr hellblaue, homogene Strukturen dar, während sie in den Thrombozyten eher blaugrau erscheinen. Die Ausstriche stammen von zwei IBD positiven Tieren.

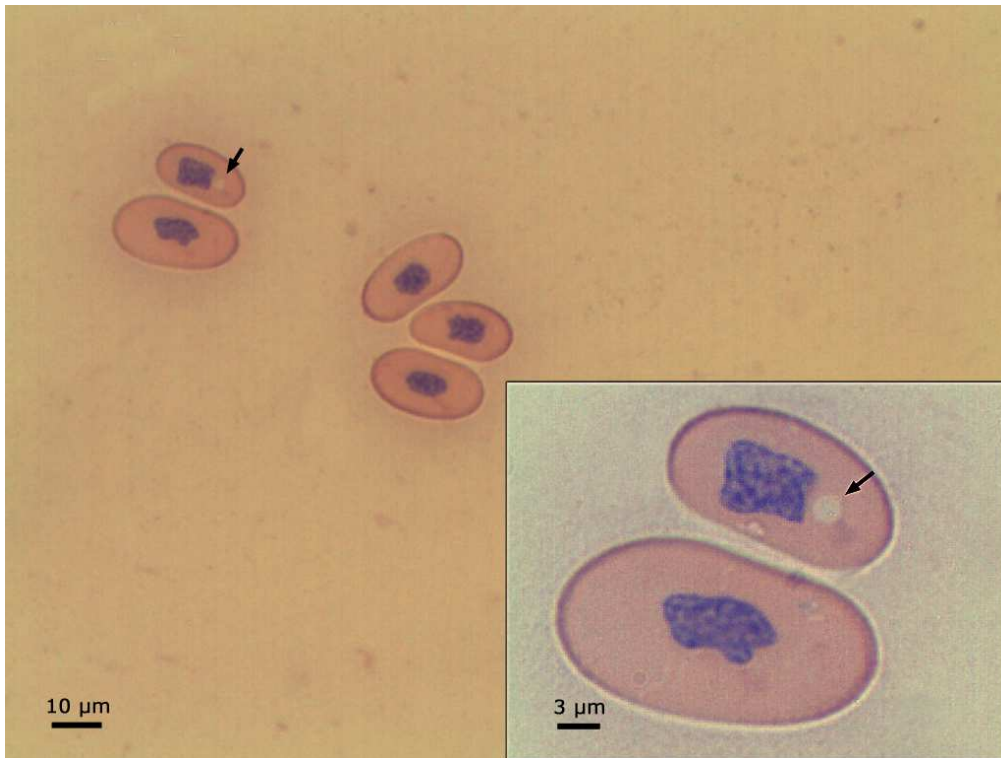


Abbildung 9: Dieser Ausstrich stammt von einer männlichen, IBD positiven *Boa constrictor imperator* (Nr. 4). Das Bild zeigt einen homogenen, runden, hellblauen Einschluss (\rightarrow) im Zytoplasma des Erythrozyten. Der Durchmesser des Einschlusskörperchens beträgt ca. 2 μm (Giemsa, 400fache Vergrößerung). Im Bildausschnitt ist der Einschluss nochmals in näherer Vergrößerung zu sehen (1000fach).

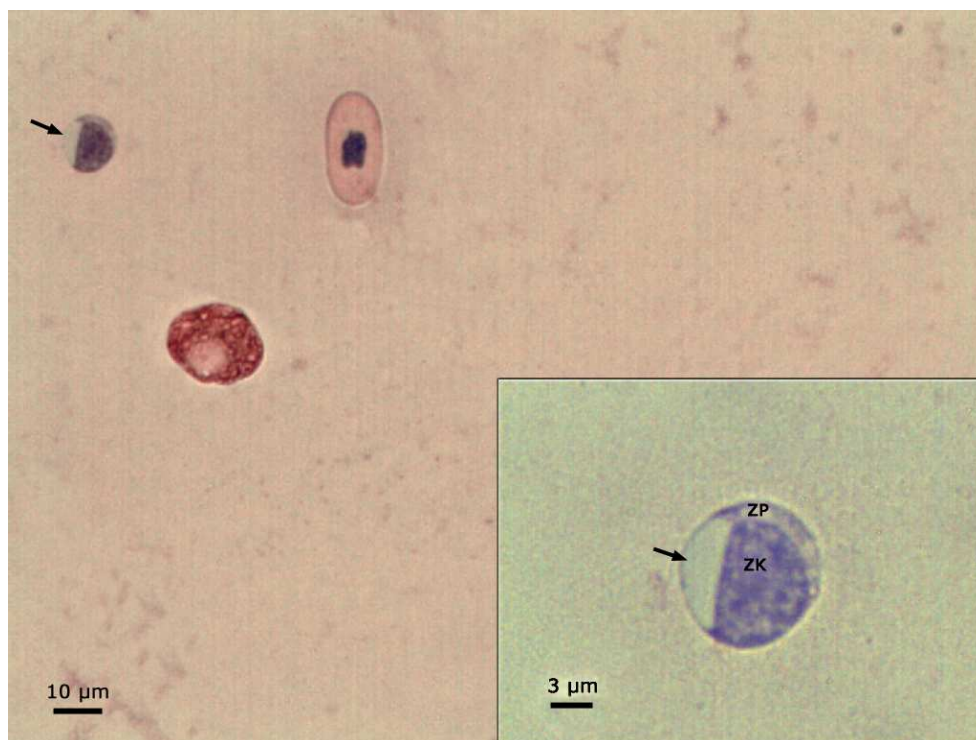


Abbildung 10: Diese lichtmikroskopische Aufnahme zeigt einen homogenen, hellblauen Einschlusskörper (\rightarrow), schön abgegrenzt innerhalb des Zytoplasmas (ZP) eines Lymphozyten. Der Zellkern (ZK) ist durch diesen leicht eingedrückt (Giemsa, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Im Durchmesser mißt der Einschluss ca. 3 μm . Der Ausstrich gehört zu derselben IBD positiven, männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 4) wie oben.

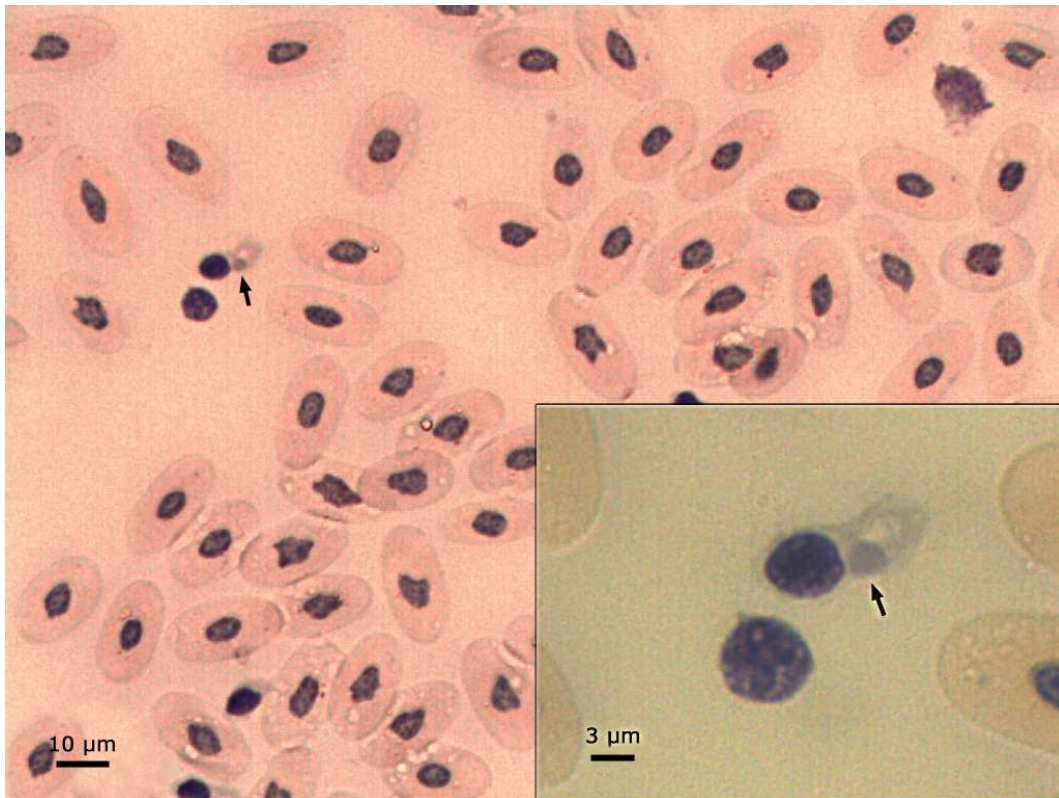


Abbildung 11: Obige Abbildung zeigt einen homogenen, runden, blaugrauen Einschluss im Zytoplasma eines Thrombozyten (→), mit einem Durchmesser von ca. 2 µm. (Giemsa, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Der Ausstrich wurde vom Blut einer IBD positiven, weiblichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 3) angefertigt.

4.4 Hämatologie

Das Augenmerk wurde insbesondere auf die Leukozytenanzahl gerichtet. Von den insgesamt 26 Tieren konnten nur 18 Werte ermittelt werden. Zum Zeitpunkt der Blutentnahme (meist *intra operationem*) lag bei 12 Tieren eine Leukozytose vor (Tab. 18). Von diesen Schlangen waren 5 Boas positiv, 3 Boas und 4 Pythons negativ. Vier positive Boas wiesen dagegen keine Leukozytose auf. Bei 2 negativen Pythons befanden sich die Leukozytenzahlen im Referenzbereich.

Die Erythrozytenzahlen zeigten keinerlei Auffälligkeiten und lagen meist im Referenzbereich (0,4-1,3 Millionen/µl) bis auf eine Ausnahme: die IBD negative Boa Nr. 22 wies eine erniedrigte Erythrozytenzahl unterhalb des Referenzwertes auf (0,15 Mio./µl).

Statistisch konnten hier keinerlei signifikante Unterschiede festgestellt werden ($p > 0,05$).

Bei 6 Schlangen (2 IBD positive Boas, eine negative Boa, 3 negative Pythons) wurde zusätzlich eine Untersuchung auf PMV (Paramyxoviren) eingeleitet, wobei bei allen das Ergebnis negativ ausfiel (Nr. 3, 6, 8, 12, 13, 14). Damit kann bei diesen Schlangen eine

Paramyxovirusinfektion als Differentialdiagnose ausgeschlossen werden. Die restlichen Tiere wurden nicht weiter daraufhin untersucht und es liegen keine Angaben vor.

Tabelle 18: Leukozyten- und Erythrozytenwerte der Schlangen

Tiernummer	Leukozyten/ μ l	Erythrozyten Mio./ μ l
Boa 1	0	0
Boa 2	0	0
Boa 3	0	0
Boa 4	0	0
Boa 5	22000	0,74
Boa 6	13000	0,40
Boa 7	16250	0,60
Boa 8	0	0
Python 9	19250	0,67
Python 10	0	0
Python 11	16250	0,64
Python 12	27500	0,88
Python 13	14000	0,84
Python 14	10000	0,43
Python 15	0	0
Python 16	0	0
Boa 17	11500	0,62
Boa 18	7750	0,43
Boa 19	13250	0,55
Boa 20	6500	0,45
Boa 21	12750	0,75
Boa 22	12500	0,15
Boa 23	19500	0,40
Python 24	9500	0,50
Boa 25	9250	0,47
Boa 26	7250	0,77

0 = keine Angabe

Bei 4 Boas wurden die Leukozyten ca. 24 Stunden nach der OP nochmals ausgezählt. Dabei konnte festgestellt werden, dass bei 3 Tieren (2 positiv, 1 negativ) die Leukozytenzahl, im Vergleich zu einer vorangegangenen Leukozytose, in den Referenzbereich zurückging. Nur bei einer positiven Boa blieb weiterhin eine Leukozytose bestehen (Tab. 19).

Tabelle 19: Blutwerte von einigen Schlangen ca. 24 Stunden nach der Leberbiopsie

Tiernummer	Leukozyten/ μl	Erythrozyten Mio./ μl
Boa 5	7250	0,52
Boa 17	6000	0,34
Boa 21	15000	0,75
Boa 22	8000	0,28

4.5 Leberbiopsie

Mit Ausnahme von 7 Tieren (Tab. 21) wurden bei allen anderen Schlangen Leberbiopiate entnommen. Insgesamt konnten 19 Leberbiopsien durchgeführt werden, von denen sich 10 als negativ und 9 als positiv erwiesen. Alle 9 positiven Biopiate stammten von Boas, während sich bei allen 6 getesteten Pythons und 4 Boas ein negatives Ergebnis herausstellte.

Die histologischen Leberpräparate wurden mit der HE-Färbung gefärbt. Teilweise kamen auch die Giemsa- und PAS-Färbung zum Einsatz, die bei später hinzukommenden Tieren nicht mehr durchgeführt wurden, da keinerlei abweichende und relevante Resultate mehr zu erwarten waren (Tab. 4). Von den 12 Giemsa gefärbten Präparaten (z. T. auch aus der Sektion) stammten 6 von positiven Schlangen (5 Boas, 1 Python) und 6 von negativ diagnostizierten Tieren (5 Pythons, 1 Boa). 11 Präparate wurden PAS gefärbt, wovon 5 von positiven Boas stammten. Die negativen Präparate gehörten zu einer Boa und 5 Pythons. In allen drei Färbungsarten konnten im positiven Fall Einschlüsse gefunden werden.

Die Leberbiopiate der positiv getesteten Tiere zeigten immer Einschlüsse, allerdings in unterschiedlicher Anzahl. Dieses positive Ergebnis wurde in den histologischen Gewebeschnitten, welche aus der teilweise vorgenommenen Sektion stammten, ebenfalls bestätigt.

Von den 12 Leberstücken, welche mittels einer Biopsienadel gewonnen wurden, konnten 2 nicht beurteilt werden, da kaum Gewebe zur Verfügung stand oder nur Erythrozyten vorhanden waren. Dafür konnten aber alle entnommenen Keilstücke gut bewertet werden.

Tabelle 20: Übersicht über durchgeführte (verwertbare) Nadel- bzw. Keilbiopsien

Tiernummer	Nadelbiopsie	Keilbiopsie	Positive(+)/ Negative(-)
Boa 1	0	0	0
Boa 2	0	0	0
Boa 3	1	1	+
Boa 4	1	1	+
Boa 5	1	1	+
Boa 6	2	1	+
Boa 7	1	1	-
Boa 8	1	0	-
Python 9	1	0	-
Python 10	0	1	-
Python 11	0	1	-
Python 12	1	1	-
Python 13	2	1	-
Python 14	1	0	-
Python 15	0	0	0
Python 16	0	0	0
Boa 17	1	1	+
Boa 18	1	1	+
Boa 19	0	1	+
Boa 20	0	1	+
Boa 21	0	1	+
Boa 22	0	1	-
Boa 23	0	1	-
Python 24	0	0	0
Boa 25	0	0	0
Boa 26	0	0	0

0 = keine Biopsientnahme; 1 = verwertbares Stück; 2 = nicht verwertbares Stück;
+ = positiv; - = negativ

4.6 Sektion/ Histopathologie

Insgesamt wurden 12 Sektionen durchgeführt, von denen 9 IBD Einschlüsse aufwiesen (7 Boas, 2 Pythons) und 3 keinerlei Einschlusskörper enthielten (1 Boa, 2 Pythons). Zusätzlich zur Leberbiopsie wurden bei 5 Tieren Sektionen durchgeführt (3 positive Boas, 1 negative Boa, 1 negative Python). Bei 7 Tieren erfolgte eine alleinige Sektion (4 positive Boas, 2 positive Pythons, 1 negative Python).

Die Ergebnisse von Blutausstrich und Leberbiopsie bzw. Sektion stimmten bis auf eine Ausnahme jeweils überein. Bei Python Nr. 16 wurden keinerlei Einschlüsse im Blutausstrich gefunden. Dafür waren aber in den histologischen Präparaten aus der Sektion Einschlüsse vorhanden und somit fiel die Diagnose für dieses Tier positiv aus. Ansonsten wiesen alle positiven Schlangen Einschlüsse sowohl in den verschiedenen Zellen des Blutausstriches als auch in der Leber bzw. den Organpräparaten auf.

Dadurch ergibt sich insgesamt ein Übereinstimmungsmaß $\kappa = 100\%$ für Blutausstrich und Leberbiopsie bzw. Blutausstrich und Sektionsergebnis bei den Boas (12 bzw. 8 Boas). Bei 4 Pythons ist $\kappa = 50\%$ für Blutausstrich und Sektion, was auf eine mäßige Beurteilung (0,21-0,6) der Übereinstimmung hindeutet. Eine Berechnung von κ für Blutausstrich und Leberbiopsie bei den Pythons ist aufgrund der unzureichenden Zahlen nicht möglich.

Tabelle 21: Gesamtüberblick der durchgeführten Untersuchungen mit Ergebnis

Tiernummer	Blutausstrich	Leberbiopsie	Sektion
Boa 1	+	0	+
Boa 2	+	0	+
Boa 3	+	+	+
Boa 4	+	+	+
Boa 5	+	+	0
Boa 6	+	+	0
Boa 7	-	-	-
Boa 8	-	-	0
Python 9	-	-	-
Python 10	-	-	0
Python 11	-	-	0
Python 12	-	-	0
Python 13	-	-	0
Python 14	-	-	0
Python 15	+	0	+
Python 16	-	0	+
Boa 17	+	+	+
Boa 18	+	+	0
Boa 19	+	+	0
Boa 20	+	+	0
Boa 21	+	+	0
Boa 22	-	-	0
Boa 23	-	-	0
Python 24	-	0	-
Boa 25	+	0	+
Boa 26	+	0	+

0 = nicht durchgeführt; + = positiv (mit Einschlusskörperchen, EK); - = negativ (keine EK)

Sowohl die Anzahl als auch die Verteilung der Einschlüsse in den verschiedenen Organpräparaten fiel sehr unterschiedlich aus (Tab. 22). Zum Teil kamen die Einschlüsse nur sehr vereinzelt vor. Generell wurden bei den untersuchten Schlangen im Thymus, Herz und in der Gallenblase keinerlei Einschlüsse gefunden. Dagegen waren bei den Boas in der Leber, Milz, Niere, Schilddrüse, Lunge, im Pankreas, Oesophagus, Magen, Darm, Muskulatur, Gehirn, Trachea und einmal im Hoden Einschlusskörperchen vorhanden. Eine sezierte, positive Python (Nr. 16) hatte nur vereinzelt vorkommende Einschlusskörperchen im Gehirn, Leber und in der Milz, während sich bei der anderen positiven Python (Nr. 15) ebenfalls nur vereinzelt Einschlüsse im Gehirn, Leber, Niere und Lunge zeigten. Auch alle 9 Boas wiesen in den Leberbiopstaten nur vereinzelt Einschlüsse in den Hepatozyten auf. Von den 7 Lebersektionspräparaten hingegen waren in 6 Schnitten deutlich Einschlüsse vorhanden, während in einem Leberpräparat nur geringgradig Einschlusskörperchen zu finden waren. Im Pankreas, in der Milz, Niere und im Darm kamen bis auf jeweils eine Ausnahme immer deutlich Einschlüsse vor. Ebenfalls ein deutliches Vorkommen an Einschlusskörperchen gab es in der Schilddrüse, im Oesophagus, Magen, Gehirn, Trachea und im Hoden. Dagegen kamen in der Lunge und in der Muskulatur meist nur vereinzelt Einschlüsse vor.

Tabelle 22: Verteilung der Einschlusskörperchen (EK) in den verschiedenen Organen der positiven Schlangen

Organe	Boa 1	Boa 2	Boa 3	Boa 4	Boa 5	Boa 6	Py 15	Py 16	Boa 17	Boa 18	Boa 19	Boa 20	Boa 21	Boa 25	Boa 26
Leber	Se +	Se +	B+/- Se+	B+/- Se+	B +/-	B +/-	Se +/-	Se +/-	B+/- Se+/-	B +/-	B +/-	B +/-	B +/-	Se +	Se +
Pankreas	+	+	+	+	0	0	-	-	+/-	0	0	0	0	+	+
Milz	+	+	-	+	0	0	-	+	+/-	0	0	0	0	0	+
Niere	+	+	+	+	0	0	+/-	-	+/-	0	0	0	0	+	+
Schilddrüse	+	-	-	+	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0
Lunge	+/-	+/-	-	+	0	0	+/-	-	-	0	0	0	0	+/-	+/-
Oesophagus	-	-	-	+	0	0	-	-	+	0	0	0	0	+	+
Magen	+	-	+	+	0	0	-	-	-	0	0	0	0	+	+
Darm	+	-	+	+	0	0	-	-	+/-	0	0	0	0	+	+
Muskulatur	-	-	-	+/-	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0
Gehirn	-	-	-	+	0	0	+/-	+/-	0	0	0	0	0	+	-
Trachea	-	-	-	-	0	0	-	-	+	0	0	0	0	+	+
Gonaden	-	-	-	-	0	0	-	-	-	0	0	0	0	-	+

0 = keine Proben; - = keine EK; +/- = vereinzelt EK; + = deutlich EK; B = Biopsie; Se = Sektion; Py = Python

Zusammenfassend lassen sich folgende statistische Aussagen machen:

Bei der Leber wurde eine Prävalenz von 100 % bei den Boas (13 von 13) errechnet mit 95 % Konfidenzintervall KI: 77,19–100 %. Beim Pankreas und der Niere ergab sich eine Prävalenz von 100 % bei den Boas (7 von 7) mit 95 % KI: 64,57–100 %. Bei der Milz konnte eine Prävalenz von 71,43 % bei den Boas (5 von 6) berechnet werden mit 95 % KI: 35,89–91,78 %. Bei der Schilddrüse wurde eine Prävalenz von 50 % bei den Boas (2 von 4) errechnet mit 95 % KI: 15–85 %. Bei Lunge und Magen ergab sich eine Prävalenz von 71,43 % bei den Boas (5 von 7) mit 95 % KI: 35,89–91,78 %. Beim Oesophagus gab es eine Prävalenz von 57,14 % bei den Boas (4 von 7) mit 95 % KI: 25,05–84,18 %. Beim Darm errechnete sich eine Prävalenz von 85,71 % bei den Boas (6 von 7) mit 95 % KI: 48,69–97,43 %.

Aufgrund zu geringer Prävalenz bzw. zu breiter Streuung im Konfidenzintervall wurden keine weiteren Angaben für folgende Organe erbracht: Muskulatur, Gehirn, Trachea und Gonaden. Die Berechnung der Prävalenz und dem Konfidenzintervall wurde bei den Pythons aufgrund der zu geringen Tierzahl unterlassen.

In Abbildung 12 ist die Verteilung der Einschlusskörperchen in den verschiedenen Organen bei den Boas anschaulich dargestellt.

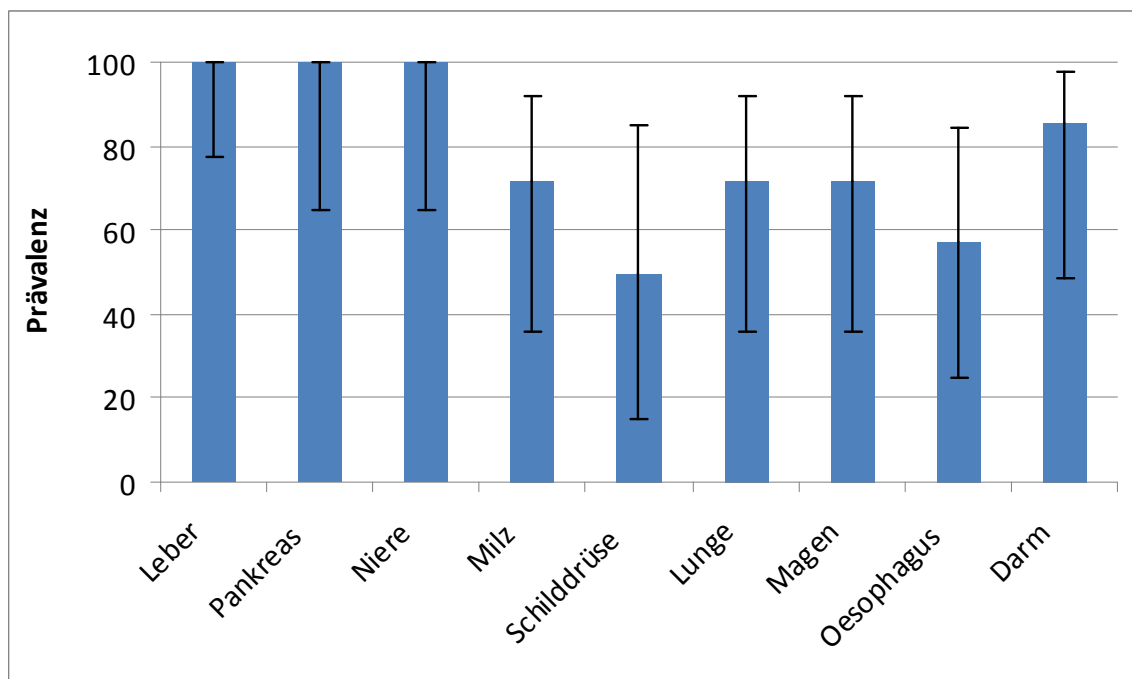


Abbildung 12: Prävalenz der Einschlüsse bei Boas (n=13) mit 95 % Konfidenzintervall in den verschiedenen Organen.

Wie bei den klinischen Symptomen waren die Organveränderungen oder Auffälligkeiten variabel und nicht besonders spezifisch.

Beim Eröffnen der Coelomhöhle fiel bei 5 Boas (4 positiv, eine negativ) eine Flüssigkeitsansammlung (Aszites bzw. Hydroperitoneum) im Bereich des Gekröses von Niere und Darm auf. Bei der Beurteilung der Leber konnte teilweise bereits makroskopisch eine Fettleber anhand der Farbe und der Konsistenz vermutet werden (Farbe hellbraun bzw. blass, brüchige Konsistenz). Dies war bei folgenden Boas der Fall: Nr. 1, 4, 5, 6, 8, 17, 21, 22, 23 (6 positive, 3 negative). Bei den Pythons konnte das nur bei einer negativen Python (Nr. 14) festgestellt werden. Bei der Beurteilung der Milz fiel z. T. noch eine Atrophie auf (4 positive, eine negative Boa). Dies konnte auch bei der Beurteilung des Pankreas festgestellt werden (2 positive Boas). Bei 6 Tieren (4 positive, eine negative Boa, eine positive und eine negative Python) konnten nephrotische Auffälligkeiten, in Form von radiärer Streifung oder weißen Erhabenheiten auf der Oberfläche, beobachtet werden. Eine positive Boa wies verkäste Follikel auf (Nr. 17). Daraufhin wurde eine bakteriologische Untersuchung dieses Organs eingeleitet und Salmonellen festgestellt. Ansonsten wurden keine massiv ausgeprägten, relevanten Veränderungen beobachtet.

Die histologischen Befunde waren z. T. ebenfalls sehr unspezifisch (Tab. 23, 24). Auffallend war das Vorliegen einer teils sehr ausgeprägten Fettleber bei 20 von insgesamt 26 Tieren (12 positive und 4 negative Boas, 1 positive und 3 negative Pythons). In der Leber, zusätzlich teilweise auch in anderen Organen, fiel eine ballonartige Degeneration der Zellkerne auf (bei 9 positiven und einer negativen Boa, 4 negativen und 2 positiven Pythons). Außerdem konnten z. T. diffuse Heterophileninfiltrate in der Leber und/oder auch in anderen Organen beobachtet werden (9 positive und 2 negative Boa, alle Pythons). Bei den beiden positiven Pythons zeigten sich lymphoplasmazelluläre Entzündungszellen. Entzündliche Reaktionen in der Lunge wiesen bei 9 von 12 untersuchten Tieren (5 positive und eine negative Boa, eine negative und 2 positive Pythons) auf das Vorliegen einer Pneumonie hin. In der Niere der oben genannten 6 Schlangen mit makroskopischen Nierenveränderungen waren z. T. Pigmente oder erweiterte Nierentubuli vorhanden, welche hier allgemein als Nephropathie bezeichnet wurden. Bei 6 positiven Boas kamen ggrd. fibrotische Veränderungen in der Leber (4 positive Boas) und/oder anderen Organen (3 positive Boas) vor. Dies konnte bei den Pythons nicht beobachtet werden.

Tabelle 23: Übersicht der histopathologischen Veränderungen bei den Boas

Pathologische Befunde	Boa 1	Boa 2	Boa 3	Boa 4	Boa 5	Boa 6	Boa 7	Boa 8	Boa 17	Boa 18	Boa 19	Boa 20	Boa 21	Boa 22	Boa 23	Boa 25	Boa 26
Fettleber	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ballonartige Degeneration des Zellkerns	Le, Pa	Le	Le, Ni	Le, Ni, Pa Mi, Oes, Ma	Le	-	-	Le	Le, Ni, Mi	-	-	Le	Le	-	-	Ni, Le	-
Heterophileninfiltrate	Le, Mi Lu	Mi, Lu	Le, Pa, Mi Lu, Oes, Ma	Le, Mi, Lu Da, Oes, Ma	Le	Le	Lu, Oes Ma	Le	Mi, Da	-	-	-	-	-	-	Lu	Da
Nephropathie	+	-	+	+	0	0	+	0	-	0	0	0	0	0	0	+	-
Pneumonie	+	+	+	+	0	0	+	0	-	0	0	0	0	0	0	+	-
Ödem/ Aszites	-	-	Gekröse (Ni, Da)	Gekröse (Ni, Da)	0	0	Lu, Gekröse (Ni, Da)	0	Gekröse (Ni, Da)	0	0	0	0	0	0	Gekröse (Ni, Da)	-
Fibrose	-	-	-	-	-	-	-	0	Le, Pa, Ni, Mi	Le	Le	-	0	-	-	Pa, Lu	Mi
Atrophie	Mi	-	Pa, Mi	Pa, Mi	0	0	Mi	0	Mi	0	0	0	0	0	0	-	Mi

0 = nicht untersucht; - = keine Veränderung; + = Veränderung, in Le = Leber, Ni = Niere, Pa = Pankreas, Mi = Milz, Lu = Lunge, Oes = Oesophagus, Ma = Magen, Da = Darm

Tabelle 24: Übersicht der histopathologischen Veränderungen bei den Pythons

Pathologische Befunde	Python 9	Python 10	Python 11	Python 12	Python 13	Python 14	Python 15	Python 16	Python 24
Fettleber	+	+	-	-	-	+	+	-	-
ballonartige Degeneration des Zellkerns	Le	Le	-	Le	Le	-	Le	Le, Pa, Gehirn	-
Heterophileninfiltrate (lymphoplasmazellulär)	Le, Ni, Mi, Lu	Le	Le	Le	Le	Le	Le,Lu,Da (Gehirn)	Lu, (Gehirn)	Haut
Nephropathie	+	0	0	0	0	0	-	+	-
Pneumonie	+	0	0	0	0	0	+	+	-
Ödem/ Aszites	Lu	0	0	0	0	0	-	-	-
Fibrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Atrophie	-	-	-	-	-	-	-	-	-

0 = nicht untersucht; - = keine Veränderung; + = Veränderung, in Le = Leber, Ni = Niere, Pa = Pankreas, Mi = Milz, Lu = Lunge, Oes = Oesophagus, Ma = Magen, Da = Darm

Es besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der Verteilung der pathologischen Befunde zwischen den positiven und negativen Tieren ($p > 0,05$).

4.6.1 Darstellung der Einschlusskörperchen

4.6.1.1 Hämatoxylin-Eosin (HE)

Tabelle 25: Färbeergebnis bei den histologischen Präparaten

Einschlusskörper im Parenchym	homogen rosarot
-------------------------------	-----------------

Es folgen nun die Ergebnisse der histologischen Untersuchung der verschiedenen Organe von IBD positiven Schlangen, welche die charakteristischen intrazytoplasmatischen, eosinophilen Einschlusskörper in den Schnitten zeigen. Die Abbildungen der histologischen Schnitte von Pankreas, Lunge, Schilddrüse, Milz, Dünndarm, Dickdarm und Muskulatur stammen von einer männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 4). Während Leber, Niere und Magen zu einer weiblichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 3) gehören. Die Abbildung des histologischen Schnittes vom Gehirn ist von einer männlichen *Python regius* (Nr. 15). Die meist rundlichen Einschlüsse werden jeweils mit schwarzen Pfeilen gekennzeichnet.

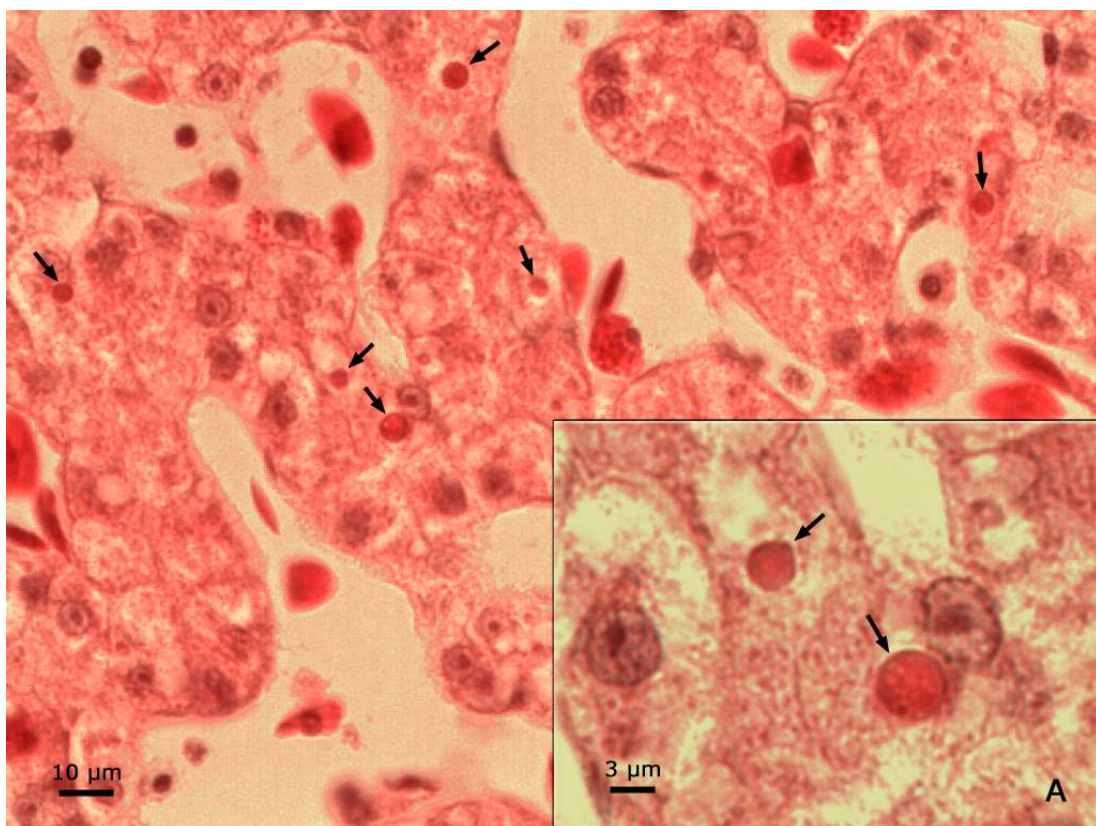


Abbildung 13: A: Dieser Bildausschnitt zeigt die typischen Einschlusskörperchen (→) in den Hepatozyten mit einem Durchmesser von bis zu 5,4 µm (HE, 400fache Vergrößerung). Im kleinen rechten Eckbild sind 2 Einschlüsse stärker vergrößert (1000fach).

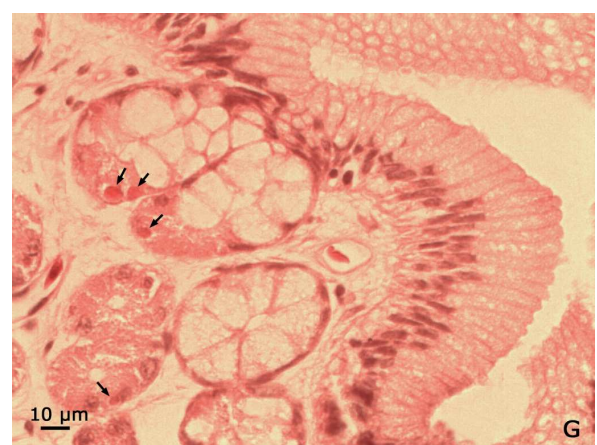
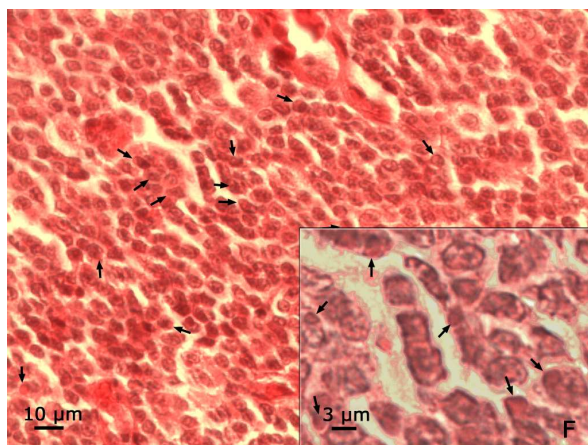
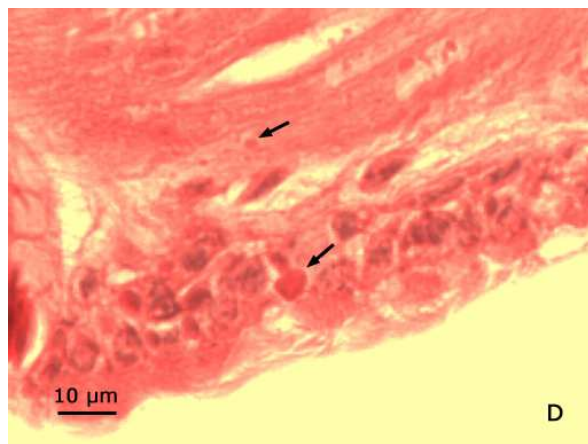
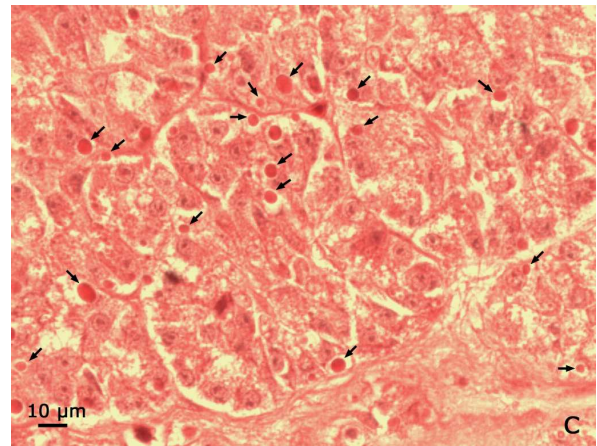
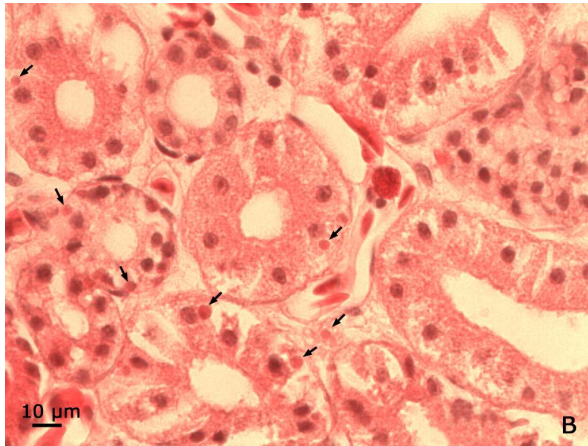


Abbildung 14: B-G: Bild **B** stellt einen Teil der Niere dar, in dem Einschlüsse in den Tubulusepithelzellen vorkommen, mit einem Durchmesser von ca. 2,5-4,5 µm (HE, 400fache Vergrößerung). In Bild **C** sind zahlreiche Einschlüsse mit einem Durchmesser von bis zu 6 µm im Pankreasparenchym zu finden (HE, 400fache Vergrößerung). Bild **D** zeigt einen kleinen Ausschnitt des Lungenepithels mit Einschlusskörperchen mit einem Durchmesser bis 5 µm (HE, 400fache Vergrößerung). Aufnahme **E** zeigt einige Einschlüsse im Schilddrüsenepithel, deren Durchmesser bis zu 4,5 µm betragen (HE, 400fache Vergrößerung). Bild **F** stellt Milzlymphozyten mit Einschlüssen dar, deren Durchmesser bis zu 2,8 µm messen (HE, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). In Bild **G** sind Einschlusskörper im Magendrüsenepithel zu sehen, deren Durchmesser ungefähr zwischen 3,5 und 6,3 µm liegt (HE, 400fache Vergrößerung).

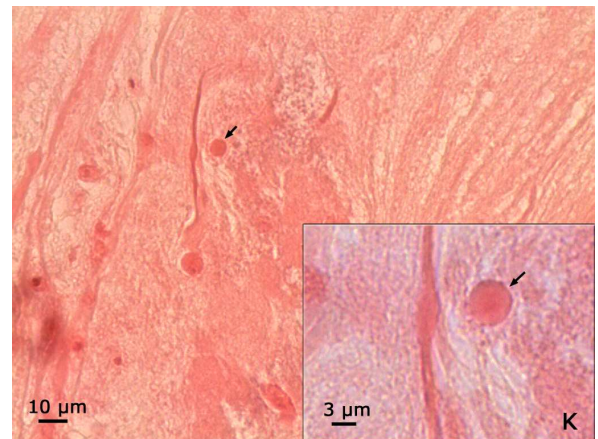
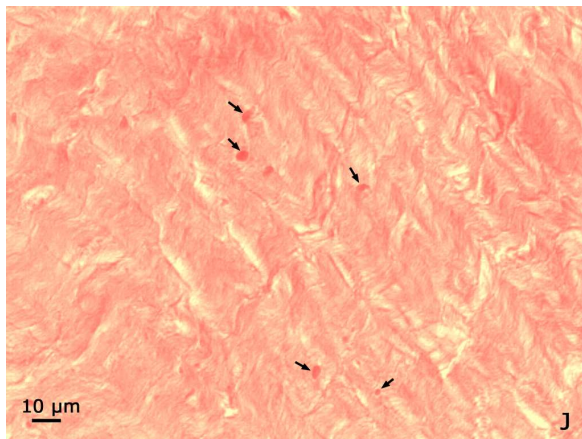
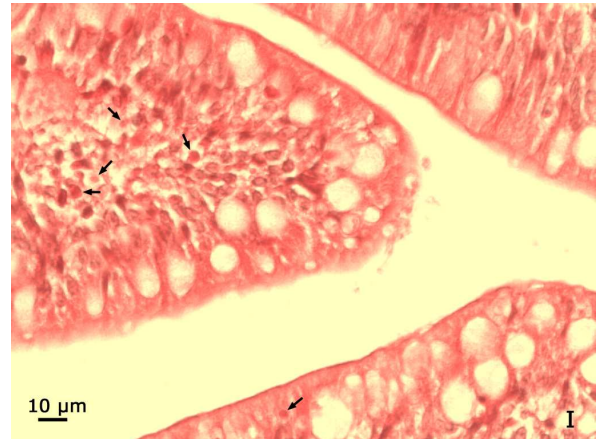
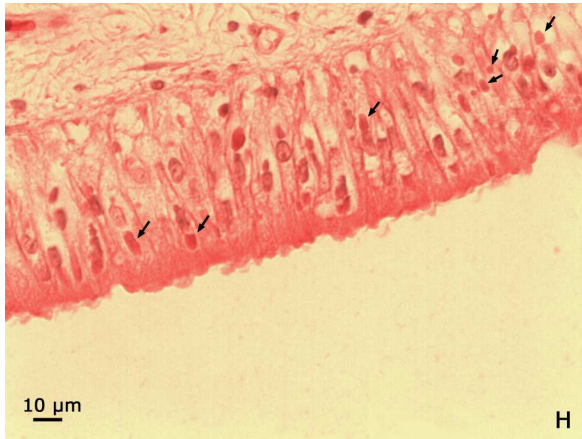


Abbildung 15: H-K: Der Dünndarmausschnitt **H** zeigt Einschlüsse, die einen Durchmesser von bis zu $4,5\ \mu\text{m}$ erreichen (400fache Vergrößerung). Aufnahme **I** stammt vom Dickdarm und zeigt Einschlusskörper mit einem Durchmesser von bis zu $5\ \mu\text{m}$ (400fache Vergrößerung). In Bild **J** ist ein Ausschnitt der Muskulatur abgebildet, in dem sich Einschlüsse befinden, deren Durchmesser bis zu ca. $4,5\ \mu\text{m}$ erreichen (400fache Vergrößerung). Und Aufnahme **K** stellt einen Einschluss im Gehirn dar, der im rechten Eckbild nochmals vergrößert ist (400fache bzw. 1000fache Vergrößerung), mit einem Durchmesser von ungefähr $5\ \mu\text{m}$. Alle oben genannten Bilder (A-K) wurden mit der HE-Färbung gefärbt.

Als Zugabe zu den Paraffinschnitten wurden von 2 IBD positiven Boas noch extra Kunststoff-schnitte von der Leber angefertigt und HE gefärbt. Die charakteristischen Einschlüsse stellen sich in den sehr dünn geschnittenen Kunststoffpräparaten (0,3 µm) besonders schön dar. Ebenso eindrucksvoll zeigen sich die Zellkerne der Hepatozyten (Abb. 16 und 17).

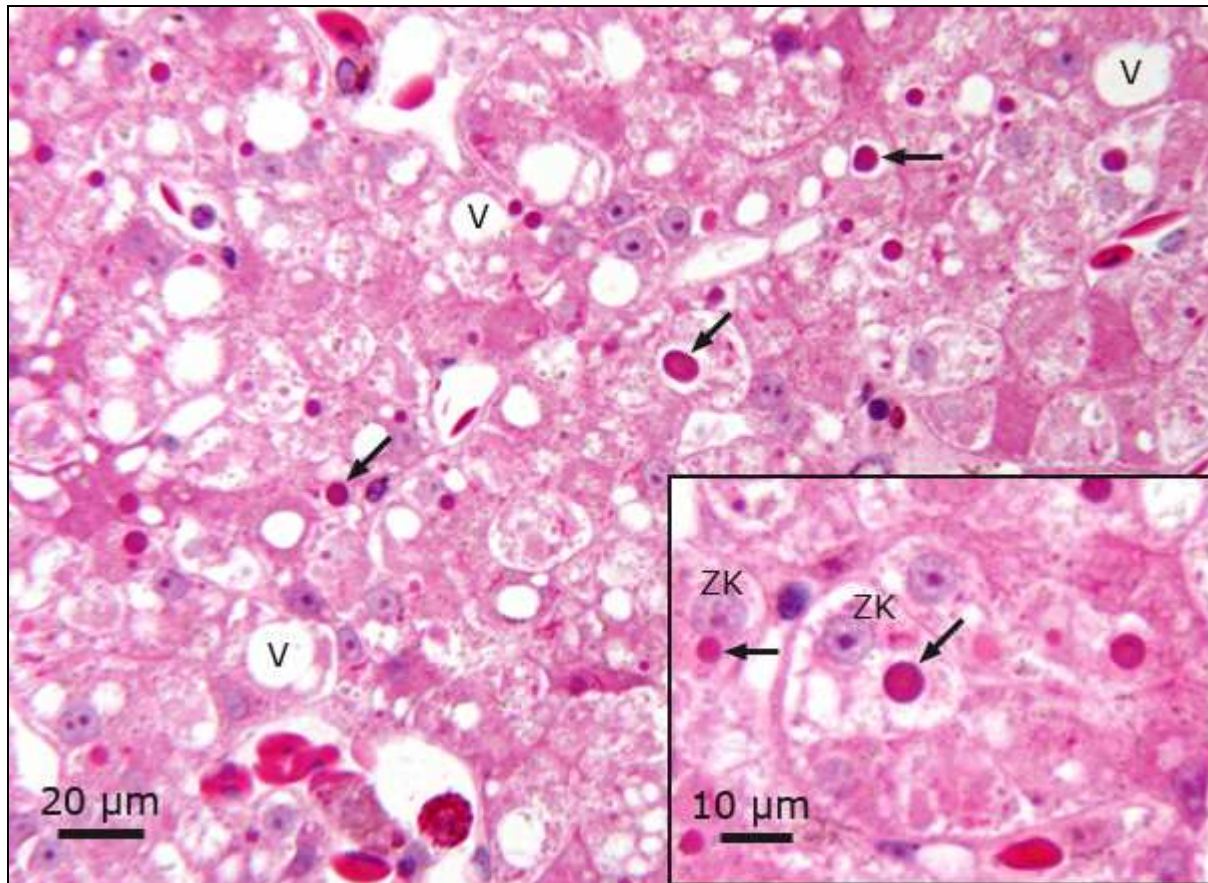


Abbildung 16: Auf diesem Bild sind multiple, intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlusskörperchen (→) in den Hepatozyten einer IBD positiven, weiblichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 25) abgebildet, deren Durchmesser bis zu 5 µm betragen. Außerdem sind einige Fettvakuolen (V) im Lebergewebe zu erkennen. Im unteren rechten Eckbild liegt ein Einschluss nahe neben einem Zellkern (ZK). HE-Färbung, Kunststoffschnitt.

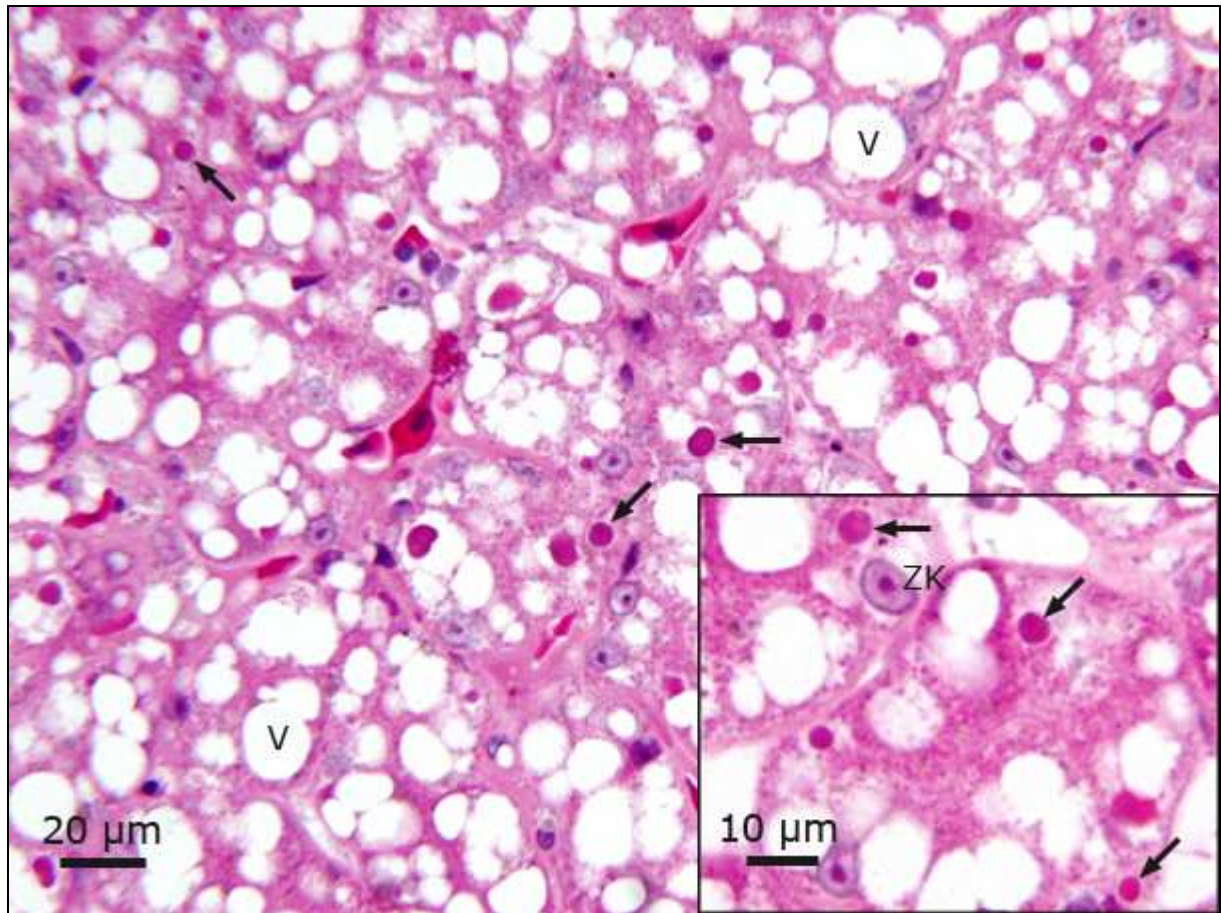


Abbildung 17: Diese Abbildung stammt von einer IBD positiven männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 26), die zusammen mit dem oben erwähnten Weibchen zusammenlebte und ebenfalls eine ausgeprägte Fettleber aufwies (Fettvakuolen V). In den Hepatozyten befinden sich multipel verteilte, intrazytoplasmatische, eosinophile Einschlüsse (→), welche einen Durchmesser von bis zu 5 µm aufweisen. Das kleine rechte Eckbild zeigt eine vergrößerte Aufnahme des Lebergewebes. Auch hier sind Einschlüsse z. T. in der Nähe eines Zellkerns (ZK) zu erkennen. HE-Färbung, Kunststoffschnitt.

4.6.1.2 Giemsa

Tabelle 26: Färbeergebnis bei den histologischen Präparaten

Einschlusskörper im Parenchym	homogen blau bzw. graublau
-------------------------------	----------------------------

Nachfolgend sind ausgewählte Organpräparate dargestellt, die von einer IBD positiven *Boa constrictor imperator* (Nr. 4) stammen. Diese enthalten die für die Giemsa-Färbung typischen basophilen, intrazytoplasmatischen Einschlüsse.

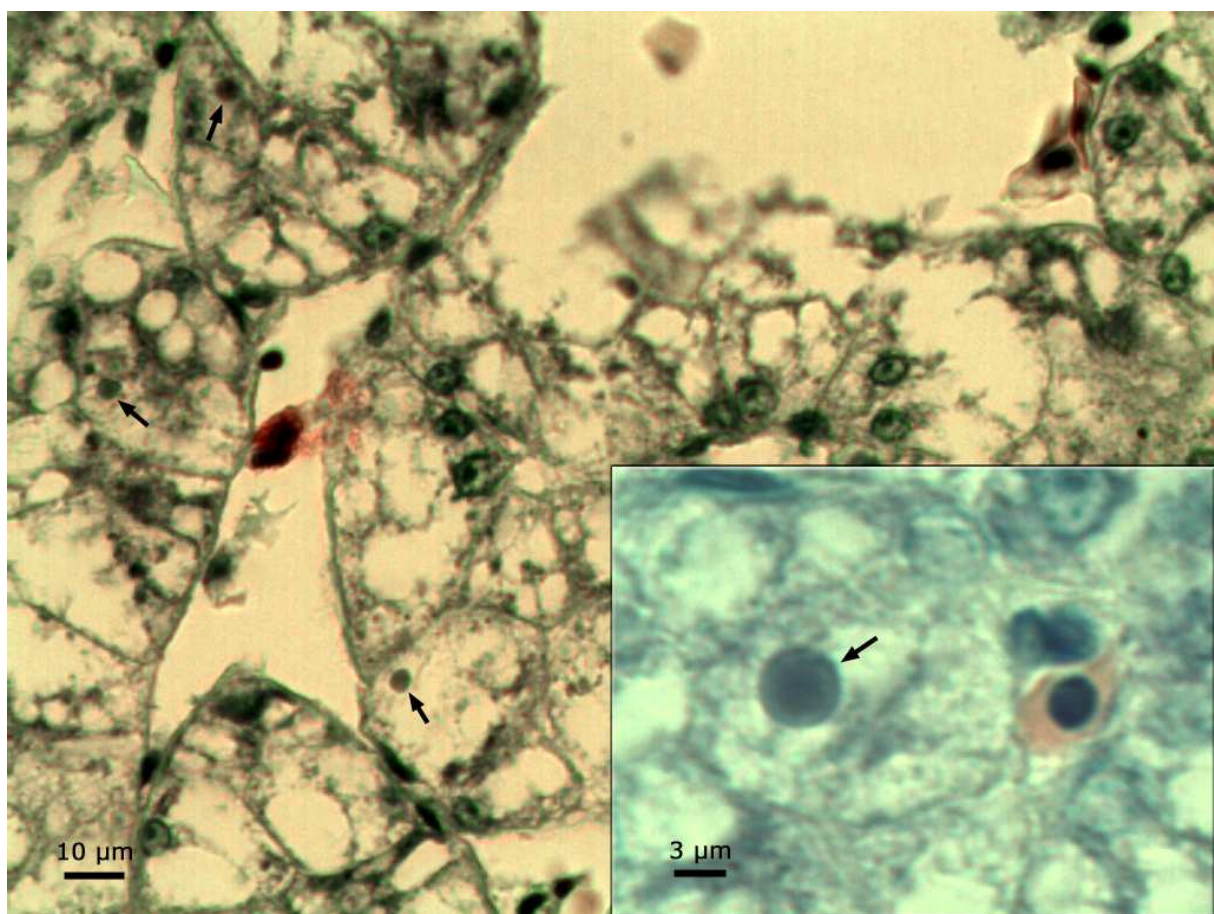


Abbildung 18: Diese Aufnahme zeigt eine Fettleber mit homogen graublauen, runden Einschlüssen (→), deren Durchmesser bis zu 5 µm messen (Giemsa, 400fache Vergrößerung). Das rechte Eckbild zeigt einen näher vergrößerten Einschlusskörper in einem Hepatozyt (1000fache Vergrößerung).

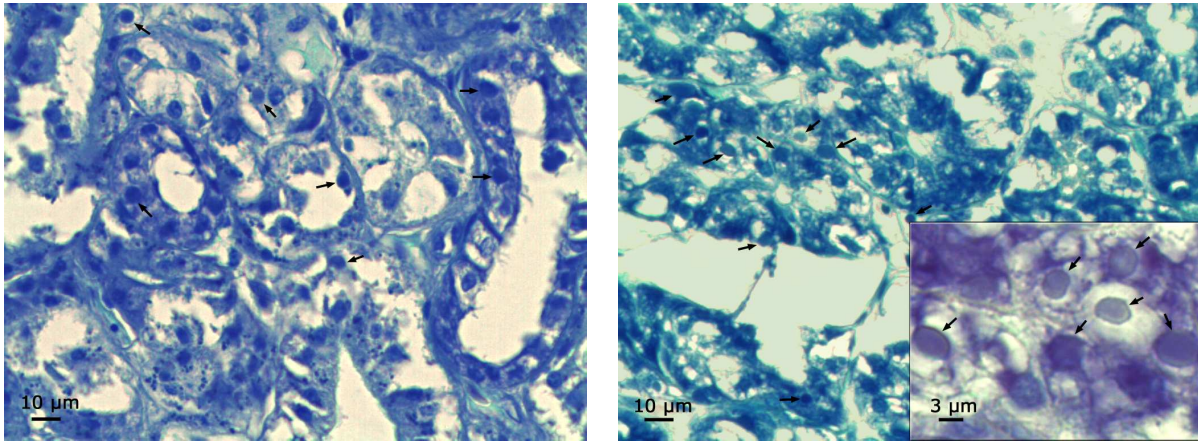


Abbildung 19: Im linken Bild sind die homogenen, blauen, runden Einschlusskörper (→) im Nierentubulusepithel zu finden. Ihr Durchmesser liegt zwischen 3,0 und 4,6 µm (Giemsa, 400fache Vergrößerung). Die rechte lichtmikroskopische Aufnahme zeigt zahlreiche Einschlüsse (→) im Pankreas, deren Durchmesser teilweise bis zu 5 µm betragen (Giemsa, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung).

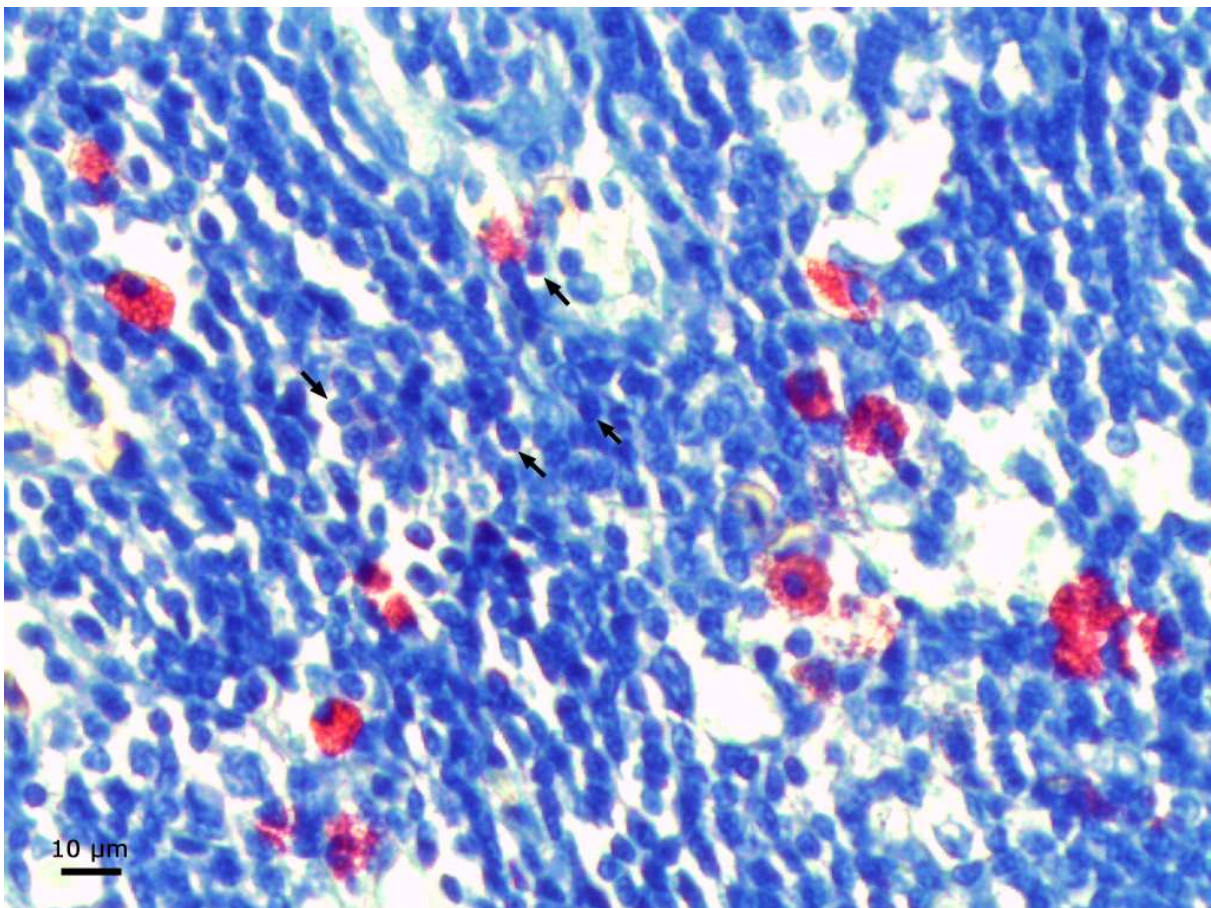


Abbildung 20: Hier ist ein Ausschnitt der Milz abgebildet. In den Lymphozyten befinden sich teilweise kleine Einschlusskörper (→) mit einem Durchmesser von bis zu 2,3 µm. Zusätzlich fällt eine ausgeprägte Heterophileninfiltration auf (Giemsa, 400fache Vergrößerung).

4.6.1.3 PAS (Periodic-Acid Schiff Reaktion)

Tabelle 27: Färbeergebnis bei den histologischen Präparaten

Einschlusskörper im Parenchym	homogen hell rosarotgräulich
-------------------------------	------------------------------

Auf den beiden unteren histologischen Bildern sind im Zytoplasma liegende, PAS negative Einschlusskörperchen zu sehen. Die Präparate stammen von einer IBD positiven, männlichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 4).

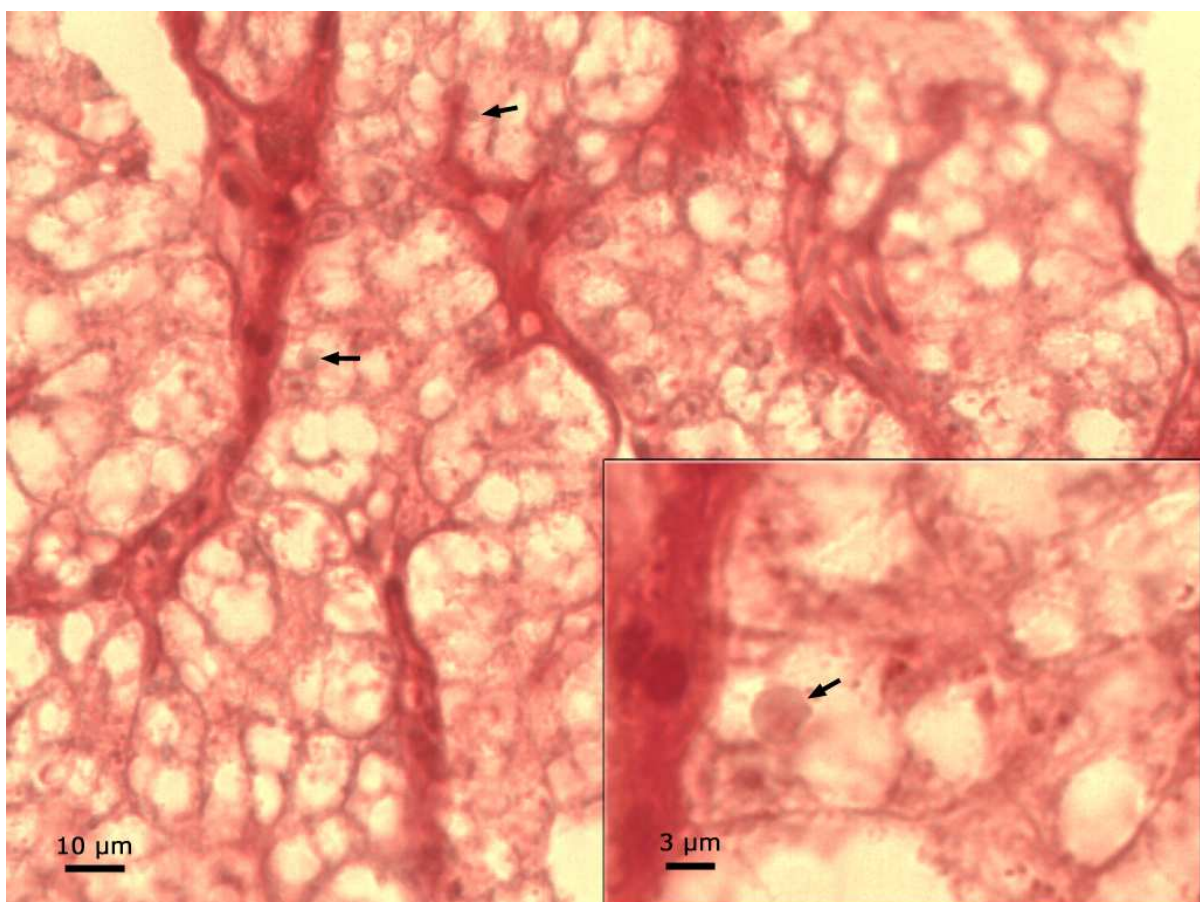


Abbildung 21: Hier sind vereinzelt Einschlusskörper (→) in der Fettleber zu finden. Diese stellen sich homogen, rund und graurosa dar. Ihr Durchmesser reicht von ca. 1,8 bis 3,6 µm (PAS, 400fache bzw. 1000fache Vergrößerung).

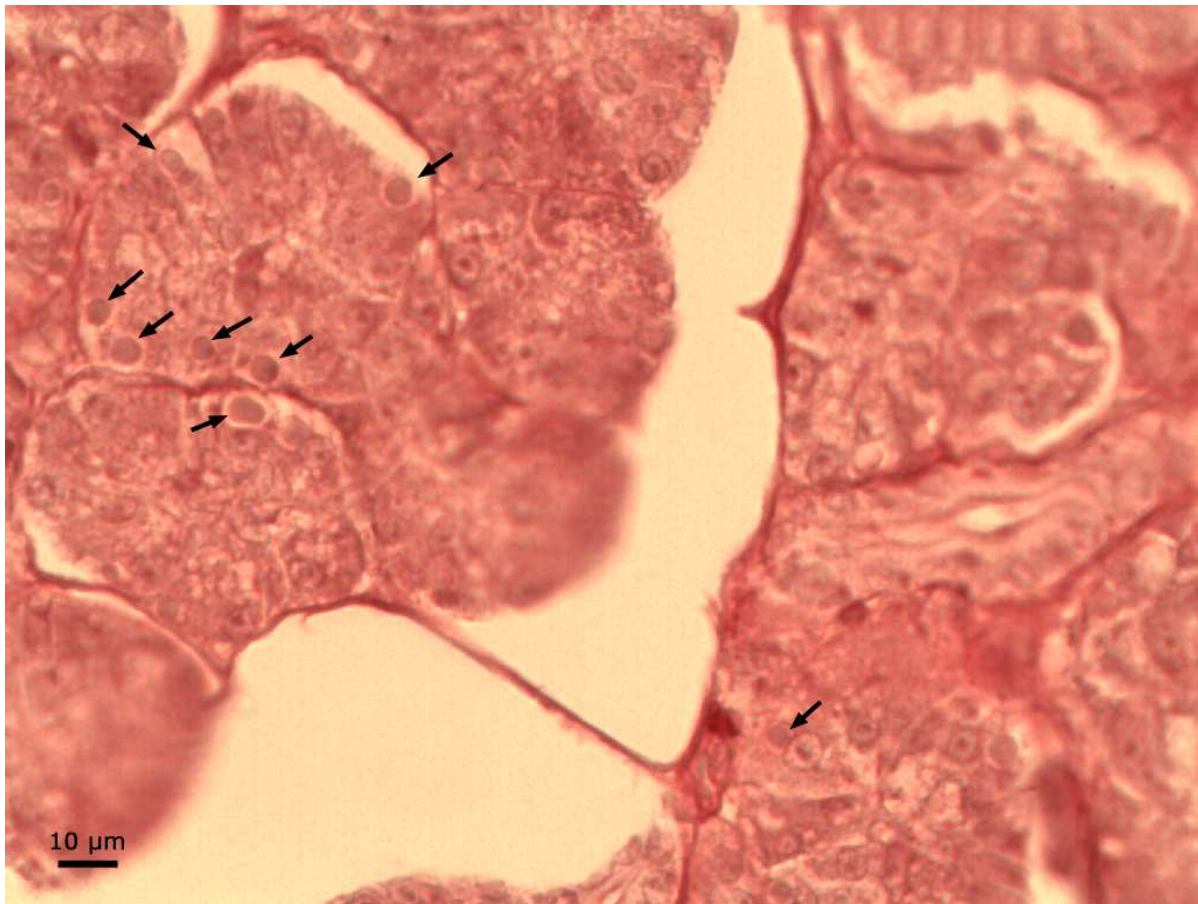


Abbildung 22: Diese Aufnahme zeigt das Pankreas mit zahlreichen PAS-negativen Einschlüssen (→), deren Durchmesser von ca. 3,6 bis 6,3 μm reicht (PAS, 400fache Vergrößerung).

4.6.1.4 Toluidinblau

Tabelle 28: Färberegebnis bei den histologischen Präparaten

Einschlusskörper	blau, z. T. blaulila
------------------	----------------------

Mit dieser Färbung der Semidünnschnitte ließen sich die Einschlusskörper besonders gut anfärben und fielen meist gleich ins Auge. In einigen Präparaten waren auch die Vakuolen in den Einschlüssen erkennbar, welche dann im Elektronenmikroskop ebenfalls sichtbar waren.

Die nachfolgenden lichtmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Toluidinblau gefärbten Organe stammen von einer männlichen IBD positiven *Boa constrictor imperator* (Nr. 4).

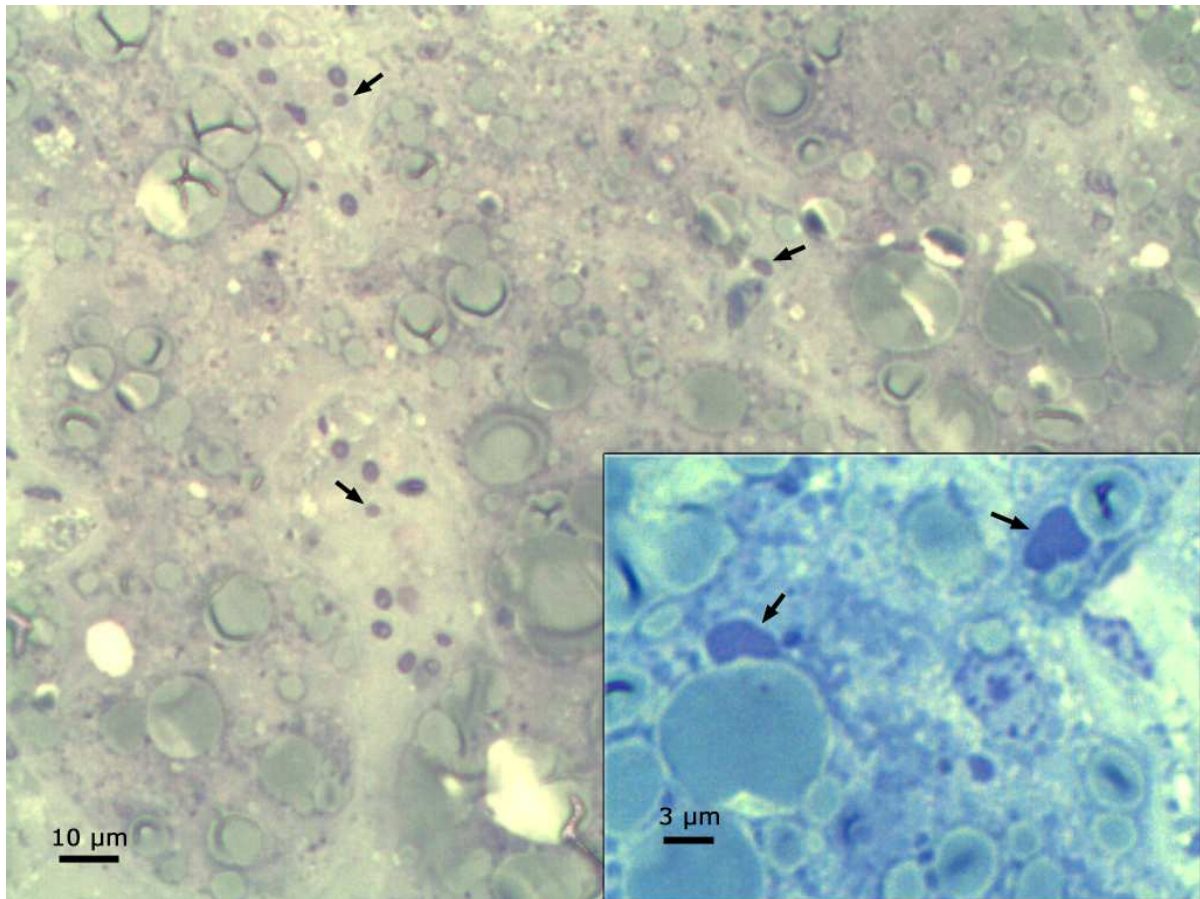


Abbildung 23: Im Lebergewebe, das mit Fettvakuolen durchsetzt ist, liegen vereinzelt die runden, blasslila bzw. blauen Einschlusskörperchen (→). Ihr Durchmesser beträgt ca. 2,7 μm (Toluidinblau, 400fache Vergrößerung). In der kleinen rechten Abbildung weisen die Einschlüsse eine polymorphe Form auf, besitzen aber eine homogene Struktur. Ihr Durchmesser mißt rund 4,1 μm (1000fache Vergrößerung).

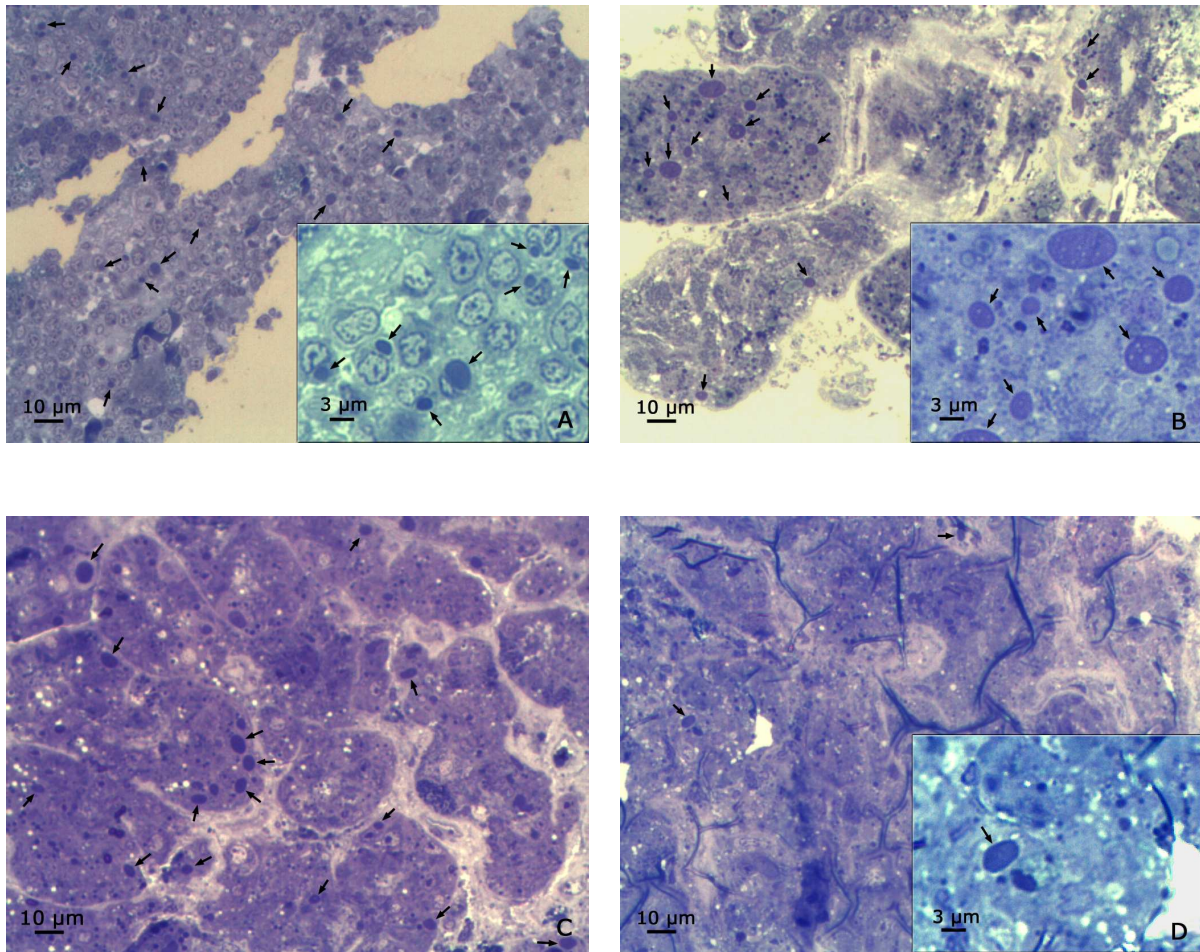


Abbildung 24: A-D: Aufnahme A zeigt einen Milzausschnitt mit zahlreichen Einschlusskörperchen (→) in den Lymphozyten. Der Durchmesser dieser homogenen, blau gefärbten, runden Einschlüsse reicht von 0,9 bis 3,6 µm (400fache Vergrößerung). Im kleineren, rechten Bild sind die Einschlusskörperchen (→) in stärkerer Vergrößerung zu sehen, deren Durchmesser bis zu 3,1 µm betragen (1000fache Vergrößerung). Zum Teil sind die Zellkerne durch die Einschlusskörper eingedrückt. In der Abbildung B stellen sich die Einschlüsse (→) in der Niere dar (Durchmesser bis zu 8 µm) (400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Im Bild C zeigen sich besonders viele Einschlüsse (→) im Pankreas. Der Durchmesser der teils ovalen, homogenen Einschlusskörperchen beträgt bis zu 6,4 µm (400fache Vergrößerung). Im Ausschnitt D vom Rückenmark ist ein Einschlusskörper (→) mit einem Durchmesser von ca. 4,5 µm zu sehen (400fache bzw. 1000fache Vergrößerung). Alle oben genannten Präparate (A-D) wurden mit Toluidinblau gefärbt.

4.6.2 Darstellung einer Leberbiopsiewunde



Abbildung 25: Die Aufnahme zeigt die Leber einer männlichen, IBD positiven *Boa constrictor* (*Boa constrictor imperator*) (Nr. 4), bei der ca. 3 Wochen vor dieser Sektion eine Leberbiopsie entnommen wurde. Die Narbe (→) liegt reizlos im Gewebe und ist gut abgeheilt.

4.7 Elektronenmikroskopie

Von den 5 Leberbiopsie- bzw. Gewebeproben für die Elektronenmikroskopie (Tab. 5) wiesen 3 Boas Einschlüsse im jeweiligen Parenchym auf, während bei zwei Pythons keinerlei Einschlüsse zu finden waren. Die durch eine Leberbiopsie gewonnene Probe bei einer positiven Boa (Nr. 5), enthielt nur vereinzelt Einschlüsse. Von 2 positiven Boas (Nr. 3, 4) wurden in der Sektion Organproben von Leber, Niere, Milz und Pankreas entnommen. Die weibliche Boa (Nr. 3) wies eine hgrd. Anzahl an Einschlüssen in der Leber auf, während die Niere und das Pankreas mgrd. betroffen waren. In der Milz konnten allerdings keine Einschlüsse gefunden werden. Bei der männlichen Boa (Nr. 4) wurde ein hgrd. Vorkommen an Einschlusskörpern in der Niere und im Pankreas festgestellt. In der Leber stellte sich eine mgrd. Anzahl an Einschlüssen dar, in den Milzlymphozyten dagegen kam nur eine ggrd. Anzahl an Einschlusskörperchen vor.

Im Anschluss sind einige elektronenmikroskopische Aufnahmen abgebildet, welche elektronendichte Einschlusskörperchen in den verschiedenen Geweben positiver Boas zeigen.

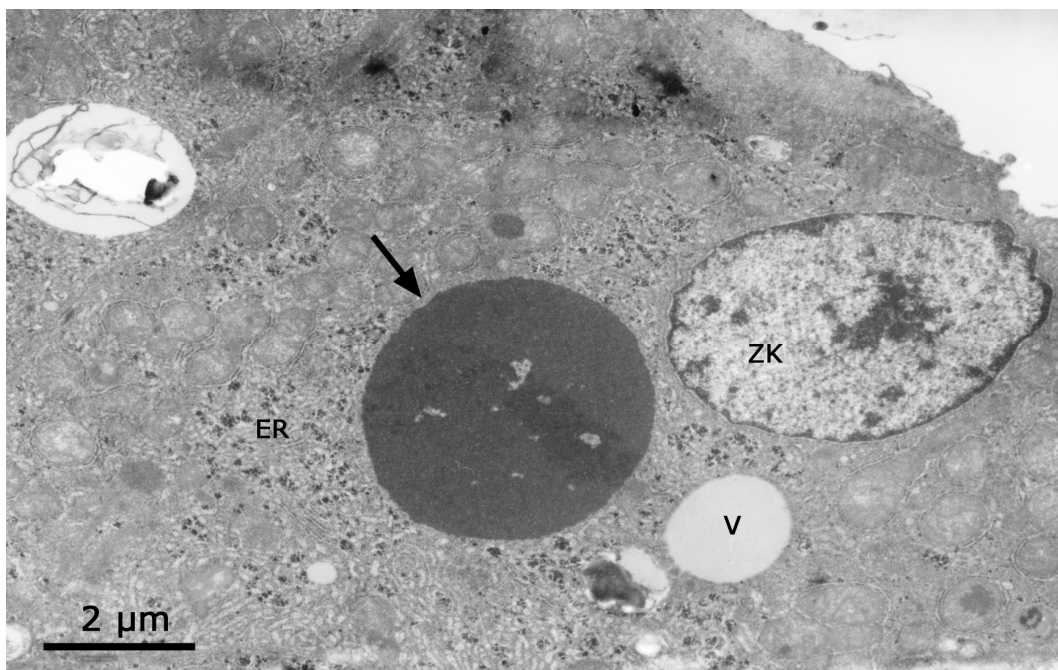


Abbildung 26: Dies ist eine elektronenmikroskopische Aufnahme von der Leber einer IBD positiven weiblichen *Boa constrictor imperator* (Nr. 3). Im Zytoplasma liegt ein Einschlusskörperchen (→) in unmittelbarer Nähe zum Endoplasmatischen Retikulum (ER) und nahe des Zellkerns (ZK). Im Inneren des Einschlusses befinden sich Vakuolen, welche Innenstrukturen aufweisen. Weiterhin ist eine Fettvakuole (V) zu sehen. Der Durchmesser des Einschlusses beträgt ungefähr 3,8 µm (8900 x Vergrößerung).

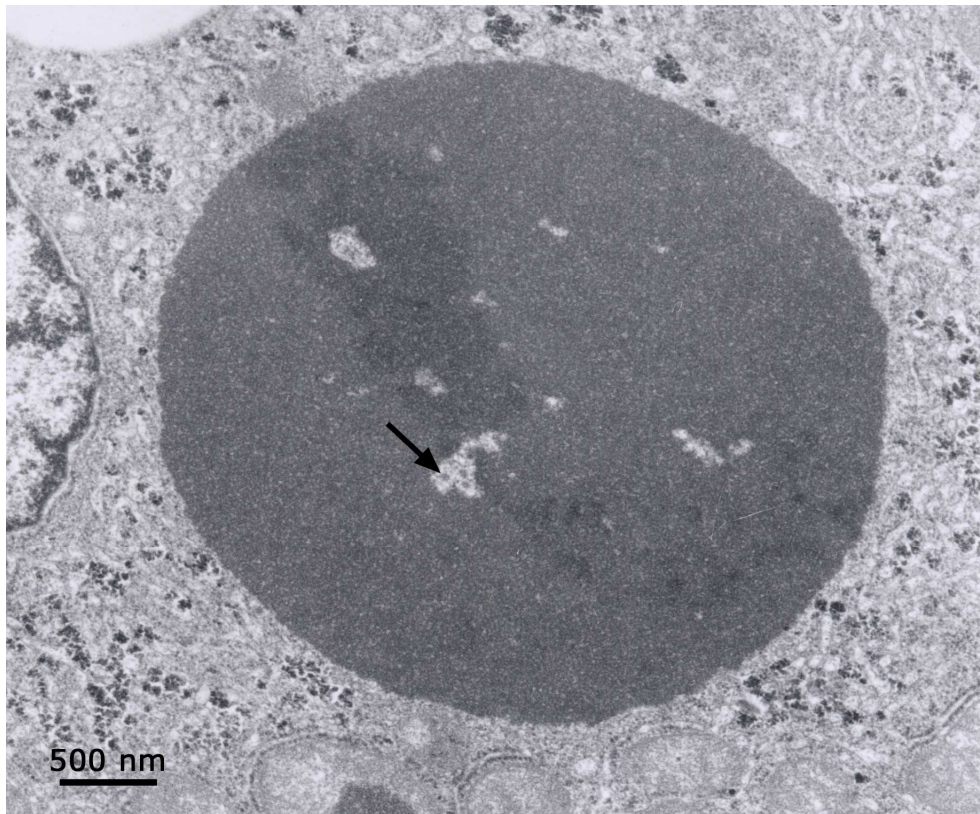


Abbildung 27: Dies ist die Vergrößerung des oben abgebildeten Einschlusses in der Leber von Boa Nr. 3. Innerhalb der Vakuolen liegen z. T. elektronendichte Partikel (→). Insgesamt ist eine granuläre, aber homogene Struktur des Einschlusses zu erkennen. (26900 x Vergrößerung).

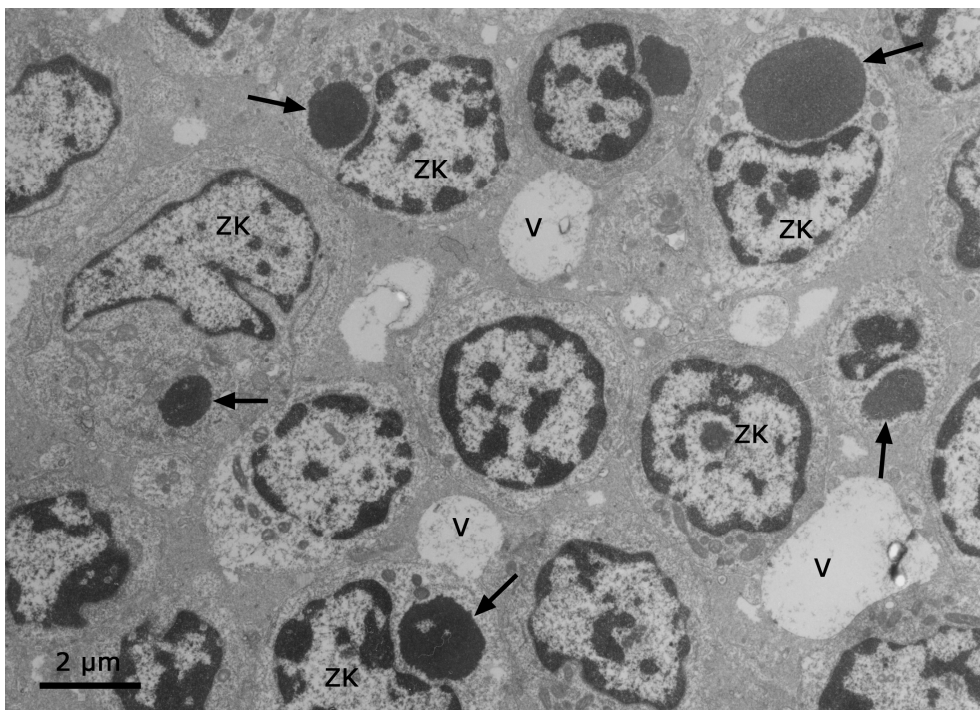


Abbildung 28: Dies ist eine elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme von einigen Lymphozyten der Milz mit je einem homogenen Einschluss (→), der z. T. den Zellkern (ZK) eindrückt. Deren Durchmesser liegt zwischen 1,0 und 2,4 µm. Am unteren Bildrand lässt sich ein Einschlusskörperchen erkennen, das Vakuolen mit kleinen Strukturen im Inneren aufweist. Es sind auch einige Fettvakuolen (V) im Gewebe verteilt. Das Präparat stammt von Boa Nr. 4 (7500 x Vergrößerung).

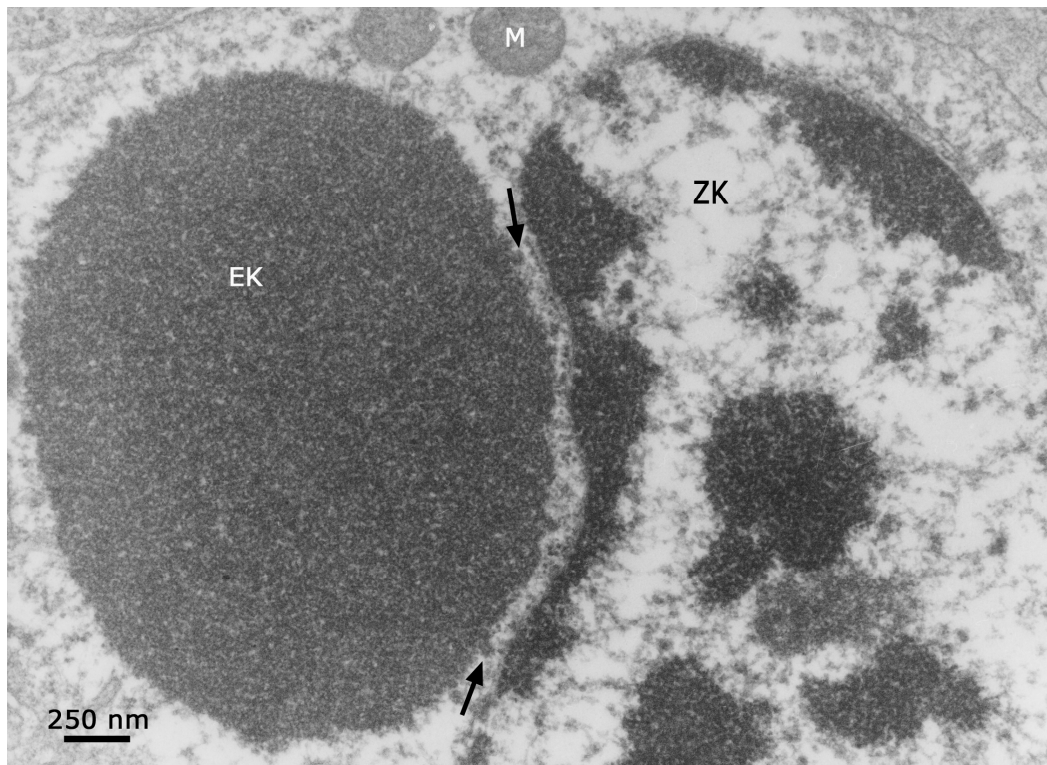


Abbildung 29: Der Ausschnitt zeigt einen der vorher abgebildeten Einschlüsse in einem Milzlymphozyt in näherer Vergrößerung (41500 x). Am Rand des Einschlusskörpers (EK) sind runde, elektronendichte Abschnürungs- oder Anlagerungsformen (→) zu sehen. Das granulär erscheinende Einschlusskörperchen drückt den Zellkern (ZK) deutlich ein. Im Zytoplasma des Lymphozyten befinden sich noch Mitochondrien (M).

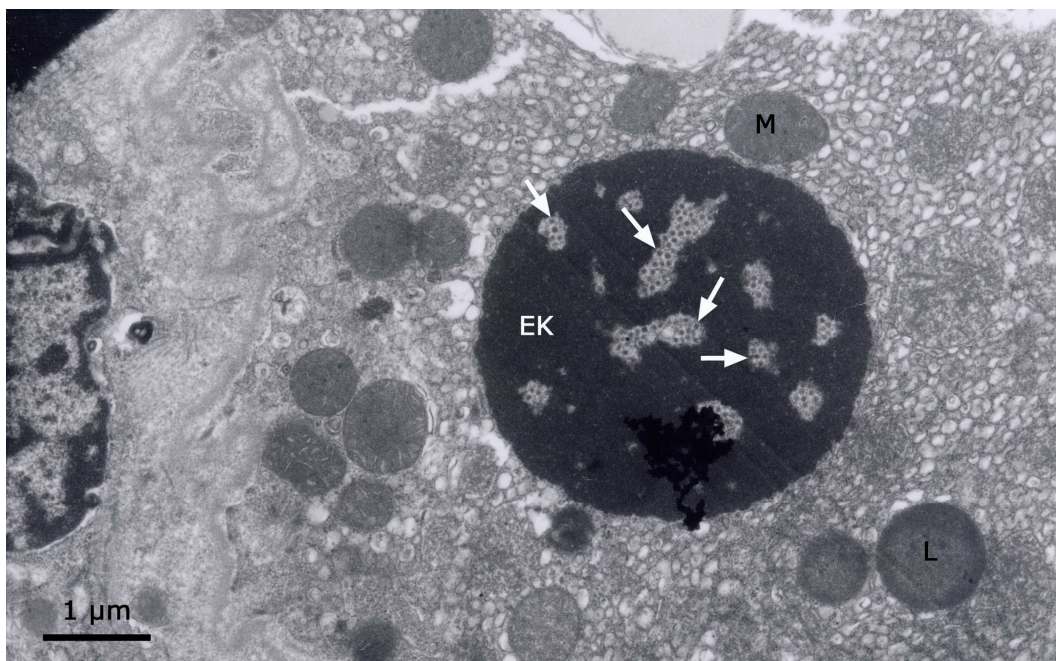


Abbildung 30: Dies ist die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Einschlusskörperchens (EK) in der Niere von Boa Nr. 3. Es enthält zahlreiche, unterschiedlich große Vakuolen (→) mit elektronendichten Innenstrukturen und einem Durchmesser von 3,6 µm. Das Einschlusskörperchen ist von Mitochondrien (M) und Lipidtröpfchen (L) umgeben (16700 x Vergrößerung).

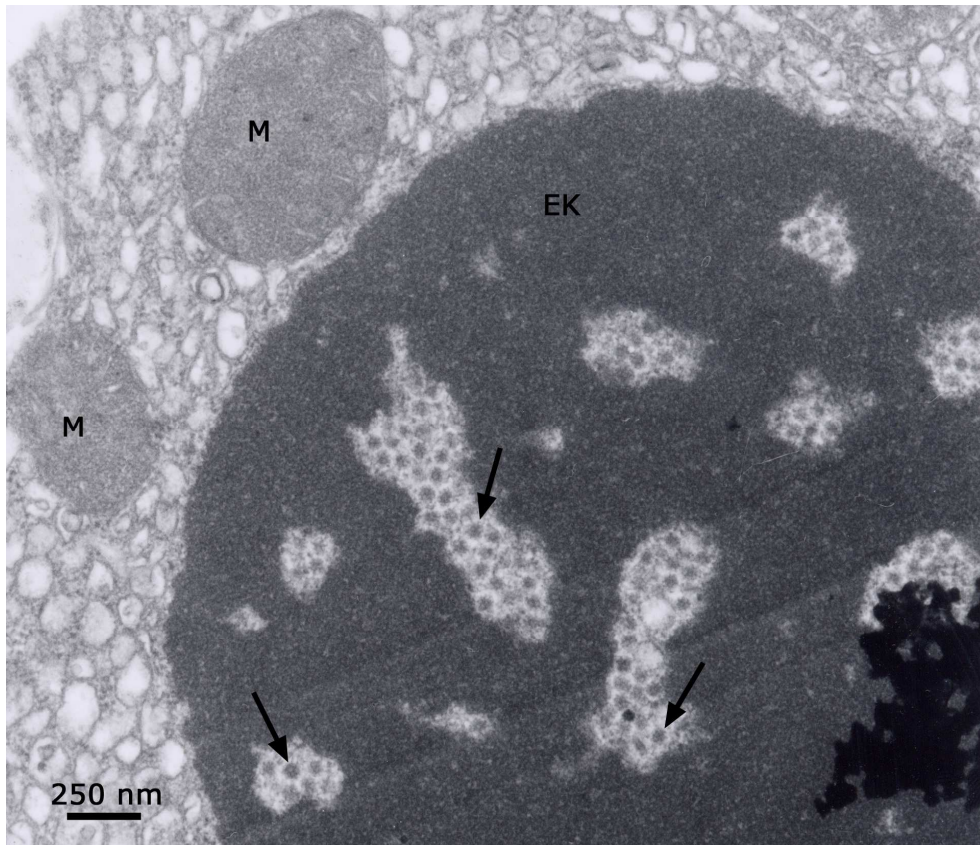


Abbildung 31: Hier ist der obige Einschlusskörper (EK) stärker vergrößert (41500 x). In den vielen Vakuolen ist z. T. die hexagonale Form der zahlreichen, elektronendichten Viruspartikel (→) im Inneren zu erkennen. Am Rand des Einschlusskörpers befinden sich Mitochondrien (M).

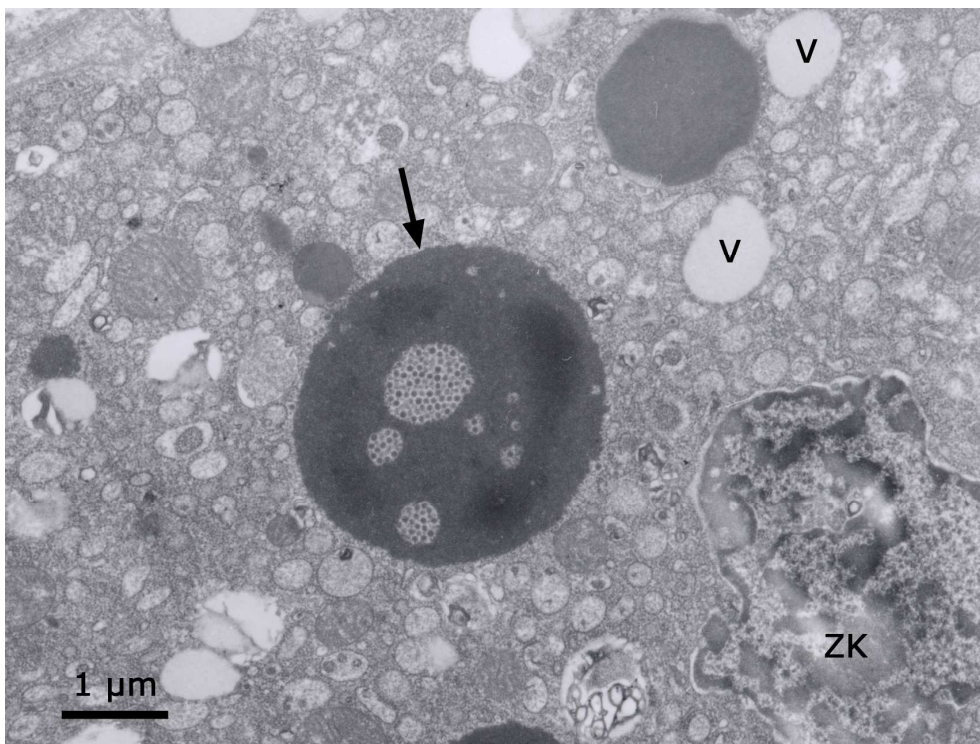


Abbildung 32: Dies ist die elektronenmikroskopische Aufnahme eines Einschlusskörpers (→) im Pankreas von Boa Nr. 3. Er weist einige Vakuolen unterschiedlicher Größe im Inneren auf, die kleine, elektronendichte Partikel enthalten. Ein Zellkern (ZK) und Fettvakuolen (V) sind ebenfalls abgebildet (13400 x Vergrößerung).

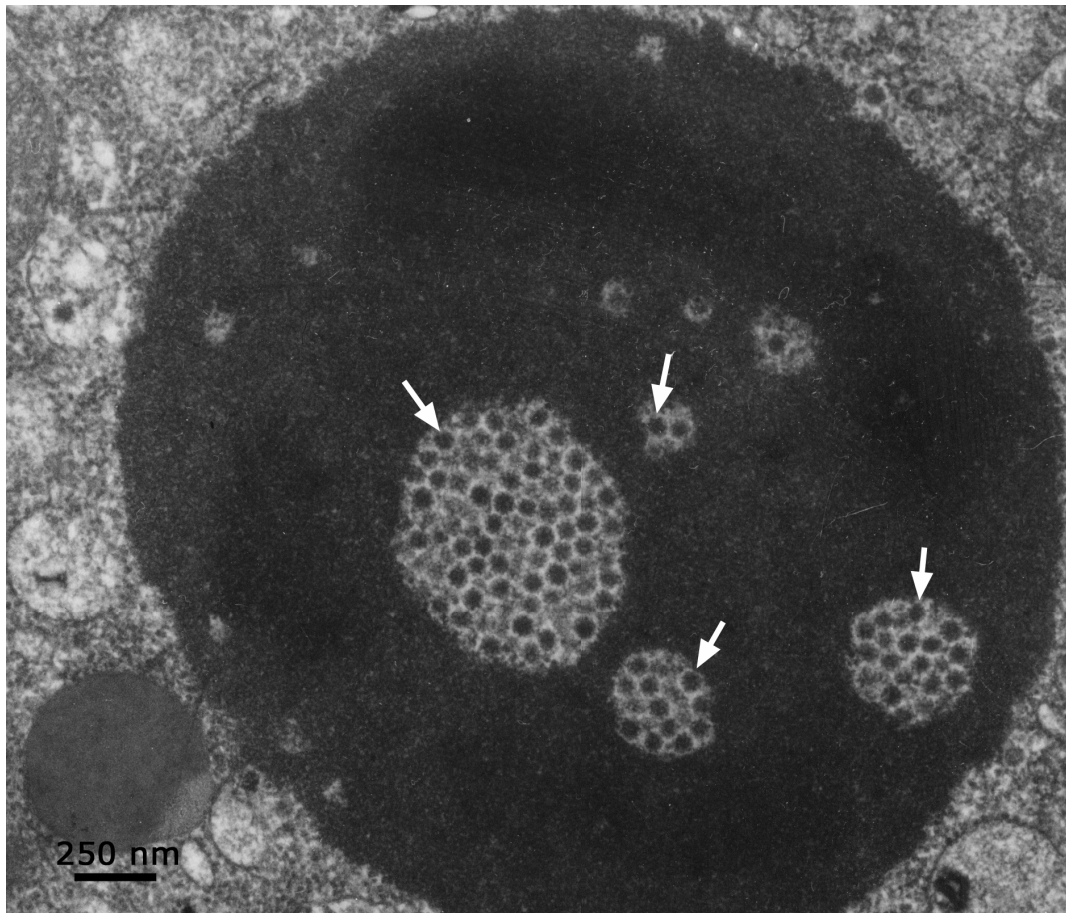


Abbildung 33: Bei näherer Vergrößerung der vorherigen Abbildung sind elektronendichte, hexagonale Viruspartikel (→) in den Vakuolen des Einschlusses zu erkennen. Im Randbereich sind einige runde Abschnürungs- bzw. Anlagerungsformen erkennbar (41500 x Vergrößerung).

5 Diskussion

5.1 Einschätzung der IBD Situation

Das Auffällige an der Tierzahl ist, dass hier v. a. Boas zur Untersuchung vorstellig wurden im Gegensatz zu Pythons. Dabei stellte sich gleichzeitig heraus, dass IBD vermehrt bei Boas nachgewiesen werden konnte. Dies deckt sich mit der Aussage von Schumacher et al. (1994). Die Autoren beschrieben schon damals einen Rückgang positiver Pythons im Vergleich zu positiven Boas. Seit Ende der 1980er Jahre konnte ein zunehmend häufigeres Auftreten von IBD bei Boas beobachtet werden. Dieser Ansicht waren auch Jacobson (1999) und Jacobson et al. (2001). Garner und Raymond (2004) stellten in ihren damaligen Untersuchungen keinen IBD Fall bei Pythons fest und vermuteten deshalb auch bei diesen Tieren ein selteneres Vorkommen an IBD im Gegensatz zu Boas. Die verschiedenen Autoren führten dafür unterschiedlich Gründe an. Schumacher et al. (1994) vermuteten eine gesteigerte Nachfrage in der Boahaltung. Demzufolge wurde eine unbekümmerte Zucht betrieben und durch die Globalisierung konnte sich diese Erkrankung weltweit ausbreiten. Diesen Trend beobachtete Schumacher (2006) weiterhin Jahre später. Und auch Keil (2009) hatte diesen Eindruck. Dies scheint heute teilweise immer noch der Fall zu sein, auch wenn insgesamt weniger IBD Fälle vorkommen. In einer tierärztlichen Praxis wurden verhältnismäßig mehr Boas mit IBD vorgestellt als Pythons (Bauer, pers. Mitteilung). Auch ein Labor (Laboklin 2010) stellte ein vermehrtes Aufkommen von IBD bei Boas im Vergleich zu IBD bei Pythons fest. Laut Blahak (pers. Mitteilung) wiederum, wird oft Untersuchungsmaterial von Pythons eingesandt, um dieses auf IBD untersuchen zu lassen, wobei sich allerdings der Verdacht dann meist doch nicht bestätigen lässt. Ein weiterer Grund für den scheinbaren Rückgang von IBD bei Pythons könnte sein, dass der akute und tödliche Verlauf von IBD bei Pythons dazu beiträgt, dass diese Tiere nicht mehr weiterführend untersucht werden und daher keine Diagnose gestellt werden kann (Jacobson 2000, Graf, pers. Mitteilung). Boas kommen meist aufgrund des oft chronischen Verlaufs erst später in der Praxis zur Vorstellung (Graf 2009), da erste Anzeichen (z. B. Gewichtsverlust, Regurgitation, Desorientierung) oft vom Besitzer nicht gleich bemerkt werden. Pees (pers. Mitteilung) stellte auch die Vermutung auf, dass Boas u. U. anfälliger für IBD sind. Somit treten IBD positive Boas häufiger auf. Dies gaben auch Jacobson et al. (2001) zu bedenken. Entweder könnte es eine Virulenzänderung des Virus gegeben haben, oder Pythons entwickelten eine Resistenz gegenüber der Erkrankung. Auch Wozniak et al.

(2000) unterstützten diese These dahingehend, dass sie eine Wirtsanpassung der Pythonsschlangen in Betracht zogen. Unterschiedliche Virusstämme könnten für die Symptomenvielfalt verantwortlich sein (Klingenberg 1999, Jacobson 2007). Generell scheinen Königspythons weniger empfänglich für IBD zu sein (Jacobson et al. 2001), wobei in dieser vorliegenden Dissertation die zwei einzigen IBD positiven Pythons Königspythons waren und drei Königspythons negativ beurteilt wurden. In einer anderen tierärztlichen Praxis kamen ebenfalls eher IBD positive Königspythons zur Vorstellung (Graf 2009). Allerdings waren insgesamt über das Jahr verteilt nur wenige positive Fälle vertreten. Jacobson (1999) und Jacobson et al. (2001) gaben als Gründe für das, ihrer Ansicht nach, seltene Auftreten von IBD bei Königspythons an, dass keine weiteren Veröffentlichungen über positive IBD Fälle bei Pythoniden vorliegen. Nur Carlisle-Nowak et al. (1998) berichteten über zwei IBD Fälle bei australischen Pythons. Ansonsten sind derzeit keine Berichte bekannt. Demgegenüber liegen mehrere Artikel über IBD bei Boas vor: Oros et al. (1998), Jacobson et al. (2001), Vancraeynest et al. (2006), Knotek et al. (2007). West et al. (2001) gaben zu bedenken, dass eine Paramyxovirusinfektion, welche eine der Differenzialdiagnosen von IBD darstellt, bei Pythons öfter vorkommen könnte als IBD. Dies vermuteten auch Garner und Raymond (2004). PMV konnte z. T. bei den in dieser Arbeit untersuchten Tieren ausgeschlossen werden. Bei den anderen Tieren war dies zwar nicht der Fall, die Schlangen zeigten aber keine für PMV (Paramyxovirus) typischen Anzeichen, weder klinisch (v. a. keine auffälligen respiratorischen Störungen (Nasenausfluss, Atemgeräusche, Beläge im Maul) oder ausgeprägte ZNS-Symptome (Kopftremor, Zwangsbewegungen)) noch in der Sektion (v. a. Lungenveränderungen) (Schumacher et al. 1994, Blahak 2000). Schumacher et al. (1994), Schumacher (2006) und Jacobson (2007) vermuteten außerdem, dass asymptomatische Träger für eine Verbreitung von IBD verantwortlich sein können. Dabei sollen Boas natürliche Wirte darstellen, während Pythons als Fehlwirte gelten (Schumacher et al. 1994). Auch mit dieser Dissertation kann demnach die scheinbar weitläufige Meinung unterstützt werden, dass heutzutage IBD bei Boas öfter anzutreffen ist als bei Pythons. Obwohl einige Pythoniden untersucht wurden, waren nur 2 Königspythons von 7 Tieren positiv zu beurteilen, während keine der Tigerpythons betroffen war. Bei den Boas kam diese Krankheit weitaus häufiger vor (13 von 17). Teilweise wiesen auch asymptomatische Boas Einschlüsse auf. Dies lässt eine hohe Dunkelziffer von IBD bei Boiden vermuten.

5.2 Beurteilung der klinischen Symptome

In der Literatur sind sehr variable Symptome angegeben, welche bei IBD positiven Tieren auftreten können. So berichteten Schumacher et al. (1994) von vielerlei unspezifischen klinischen Anzeichen, wie z. B. Lethargie, Anorexie, Gewichtsverlust und Dehydratation. Diese wurden auch bei den hier untersuchten, positiven Tieren festgestellt, teilweise aber auch bei IBD negativen Schlangen diagnostiziert. Dabei trat eine Dehydratation ausschließlich bei positiven Boas auf. Eine der meist erwähnten klinischen Symptome stellen bei Boas chronische Regurgitation, Dysecdysis und ein reduzierter Umkehrreflex dar (Schumacher et al. 1994, Wozniak et al. 2000, Jacobson et al. 2001, Raymond et al. 2001). Auch diese Auffälligkeiten konnten bei einigen Tieren beobachtet werden. Allerdings zeigte nur eine der positiven Boas chronische Regurgitation, welche bei Pythons nicht auftrat. Dies wird auch von verschiedenen Autoren bestätigt (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001, Mitchell 2004). Häutungsstörungen und einen reduzierten Umkehrreflex zeigten v. a. die positiven Tiere, insbesondere die Boas. Die im Ergebnis erwähnten trüben Brillen könnten auch mit der Häutung(-sstörung) in Zusammenhang gebracht werden. Bei Pythons stehen akute neurologische Störungen im Vordergrund (Schumacher et al. 1994, Carlisle-Nowak et al. 1998, Blahak 2000, Jacobson et al. 2001, Raymond et al. 2001, Schumacher 2006): Kopftremor, Opisthotonus, Stargazing, Gleichgewichtsstörungen und Paralysen v. a. in der kaudalen Körperhälfte, welche aber ebenso bei Boas beobachtet wurden. In der hier durchgeführten Untersuchung konnten außer Koordinationsstörungen bei einer negativen Python keinerlei solcher ZNS-Symptome bei den Pythons festgestellt werden. Dagegen wurde Stargazing und ein reduzierter Muskeltonus bei 4 positiven Boas beobachtet. Opisthotonus kam nur bei 2 negativen Boas vor. Ein verändertes Verhalten in Form von Aggressivität legten jeweils eine positive Boa und Königpython an den Tag. Dies ist für diese Tiere ein ungewöhnliches Symptom, da sie normalerweise friedliche Schlangenarten darstellen. Dabei könnte es sich um ein Anzeichen des Unwohlseins handeln. Bei den Tigerpythons kommt dies hingegen öfters vor und konnte bei 3 Tigerpythons festgestellt werden. Teilweise sind diese Arten bekannt für ihre Aggressivität. Marschang (2004) und Keil (2009) berichteten auch von einer Anisokorie bei positiven Boas, welche bei der Untersuchung hier ebenfalls bei einem Tier auffiel. Dieser Befund könnte auf eine Störung im zentralen Nervensystem hindeuten. Schumacher et al. (1994), Jacobson et al. (2001), Knotek et al. (2007) und Keil (2009) brachten auch Schlangemilben als Vektoren für das Virus mit IBD in Verbindung. Ein Milbenbefall kam in dieser vorliegenden Arbeit allerdings nur bei einer positiven und zwei

weiteren, negativen Pythons vor. Bei keinen der Boas konnten Milben festgestellt werden. Oft kommen auch Sekundärinfektionen hinzu, wie Stomatitis oder eine Pneumonie (Schumacher et al. 1994, Oros et al. 1998, Wozniak et al. 2000, Jacobson et al. 2001, Garner und Raymond 2004). Die Ursache könnte eine Immunsuppression sein, welche durch das mutmaßliche Virus hervorgerufen wird (Jacobson 2007). Eine Pneumonie wurde bei den vorliegenden Untersuchungen insbesondere bei positiven Tieren diagnostiziert. Ebenfalls konnten bei einigen positiven Boas und auch bei 2 negativen Pythons, Darmparasiten (Flagellaten) festgestellt werden. Diesen Befund beobachtete auch Homer (1999). Eine positive Boa (Nr. 25) wies Durchfall auf. Diesen Befund konnten auch Knotek et al. (2007) bei ihren Untersuchungen feststellen. Zum Teil traten auch untypische klinische Manifestationen auf, wie z. B. Hauttumore und Dermatitis (Klingenberg 1999, Schumacher 2006, Vancraeynest et al. 2006, Jacobson 2007), welche hier allerdings nicht nachgewiesen werden konnten. Somit soll auch nicht weiter darauf eingegangen werden. Im Allgemeinen weist IBD bei Pythons einen (per)akuten Verlauf mit ausgeprägten ZNS-Störungen auf, während Boas als asymptomatische Träger gelten und oft eine Chronizität mit Sekundärinfektionen zeigen (Schumacher et al. 1994, Mader 1999, Blahak 2000, Jacobson et al. 2001, Marschang 2004). Die meisten, der in dieser Arbeit untersuchten Tiere, hatten wenig klinische Auffälligkeiten, die oft auch nur gering ausgeprägt waren. Einige wiesen sogar ein ungestörtes Allgemeinbefinden auf und schienen bei bester Gesundheit zu sein, wobei sich im Nachhinein, speziell bei 3 Boas, IBD herausstellte, was die These der asymptomatischen Träger bei Boiden durchaus nachvollziehbar macht. Aufgrund dieser Befunde ist keine eindeutige Zuordnung möglich und somit auch weiterhin kein pathognomonisches Symptomenbild bei den IBD positiven Tieren erkennbar. Selbst neurologische Störungen können weiterhin nur einen Hinweis auf einen IBD Verdacht liefern, da sich in den vorliegenden Untersuchungen solche Tiere auch oft als negativ herausstellten. Aber andererseits konnte bei Tieren mit unspezifischer Symptomatik IBD festgestellt werden. Das heißt also, dass bei sämtlichen Tieren, ob und welche klinischen Symptome sie auch zeigen, IBD in Betracht gezogen werden sollte, auch wenn die Symptomatik lediglich nur ein Indiz geben kann.

5.3 Bewertung der Untersuchungsmethoden

Als Diagnostikum der Wahl steht nach wie vor das Auffinden typischer Einschlusskörperchen in viszeralen Epithelzellen im Vordergrund (Schumacher et al. 1994, Klingenberg 1999, Schumacher 2006, Jacobson 2007). Dabei kann die Anzahl der Einschlüsse sehr unter-

schiedlich ausfallen. Ebenso variieren die betroffenen Organe von Fall zu Fall (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001), wobei die Einschlüsse besonders häufig in der Leber (70%), Niere (70%), im Pankreas (100%) und den oesophagealen Tonsillen auftraten. Aufgrund dessen kamen wir auf die Idee, jeweils einen Blutausstrich und eine Leberbiopsie im Vergleich durchzuführen und zu bewerten. Dabei sollte maßgebend für die Bewertung sein, inwieweit die alleinige Beurteilung eines Blutausstriches ausreichend ist, da eine Blutentnahme einen weniger invasiven Eingriff darstellt. In jeweils beiden Präparaten waren hier stets Einschlüsse vorhanden, auch wenn diese in unterschiedlicher Menge zu finden waren.

5.3.1 Blutausstrich

Früher wurde hauptsächlich nach Einschlüssen in den Erythrozyten gesucht (Schumacher et al. 1994). Dies berichteten auch Jacobson et al. (2001) und Mitchell (2004). Nach Keils (2009) Einschätzung kommen dagegen nur bei Boas Einschlüsse in den Erythrozyten vor, während bei Pythons keinerlei Einschlusskörperchen in Erythrozyten zu finden sind. Diese Meinung kann mit den vorliegenden Untersuchungen, im Hinblick auf das Vorkommen von Einschlusskörperchen in Erythrozyten bei Boas, teilweise bestätigt werden. Zumindest bei den meisten Boas kamen Einschlusskörperchen in den Erythrozyten vor. Bei den untersuchten Pythons lässt sich aufgrund der zu geringen Tierzahl, nur schwer eine Aussage treffen. Deshalb kann Keils (2009) Ansicht hier nur bedingt unterstützt werden. Denn bei einer positiven Python waren stark vereinzelt Einschlüsse ausschließlich in den Erythrozyten aufzufinden, während es bei der anderen Python keinen Hinweis auf Einschlusskörperchen in den Blutzellen gab. Jacobson et al. (2001), Schumacher (2006) und Jacobson (2007) fanden Einschlüsse allerdings auch in den Lymphozyten. Im Rahmen dieser Dissertation kamen diese in den beurteilten Blutausstrichen bei allen positiven Boas vor. Schumacher (2006) und Jacobson (2007) beschrieben noch zusätzlich Einschlüsse in Thrombozyten und in Granulozyten, welche allerdings seltener auftraten. Auch in dieser vorliegenden Arbeit konnten Einschlusskörperchen in Thrombozyten etwa bei der Hälfte der Boas gefunden werden. Einschlüsse in den Granulozyten wurden hingegen nicht festgestellt. Knotek et al. (2007) wiederum fanden keinerlei Einschlüsse in Erythrozyten oder Lymphozyten. Da z. T. nur wenige Einschlüsse in den Blutzellen vorkommen und diese u. U. übersehen werden könnten, schlägt Keil (2009) vor, verdächtige, aber negativ getestete Tiere nach einiger Zeit nochmals nachzutesten. Bei den vorliegenden Untersuchungen kamen stets

Einschlusskörperchen bei den positiven Boas vor. Dabei variierten nur die Blutzellen, in welchen Einschlüsse zu finden waren. Zu 100% wurden sie in Lymphozyten angetroffen. Auch die jeweilige Menge der Einschlusskörperchen unterschied sich von Tier zu Tier. Teils war eine große Anzahl im Ausstrich zu finden; bei anderen kamen nur sehr vereinzelt Einschlüsse vor.

Mader (1999) erwähnte noch zusätzlich eine Beobachtung bei den Heterophilen. Ihm fiel auf, dass diese Blutzellen zytotoxisch verändert waren. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte dies zumindest bei den positiven Boas festgestellt werden. Solche zytotoxischen Zellen traten weder bei den gesunden Schlangen noch bei den positiven Pythons auf. In wie fern dieser Befund bei IBD positiven Boas tatsächlich eine Rolle spielt, bleibt offen.

Bei der Beurteilung von Blutausstrichen wird in der Literatur hauptsächlich von Giemsa gefärbten Blutausstrichen berichtet (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001, Garner und Raymond 2004, Jacobson 2007). In der vorliegenden Arbeit stellen sich aber die Einschlüsse in der DiffQuik-Färbung markanter dar (Abb. 1-7). Sowohl in den Erythrozyten als auch in den Thrombozyten und Lymphozyten sind die Einschlusskörperchen besser erkennbar als in den Giemsa gefärbten Blutausstrichen, in denen sich die Einschlüsse z. T. nur sehr schwach anfärben ließen und sie deshalb u. U. leichter übersehen werden können. Hinzu kommt, dass die DiffQuik-Färbung in der Praxis einfacher in der Handhabung ist im Vergleich zur Giemsa-Färbung. Der Aufwand hält sich in Grenzen, da in vielen Praxen heutzutage die DiffQuik-Färbung bereits ein fester Bestandteil ist. Die Beurteilung kann gleich im Anschluss an die schnell durchführbare DiffQuik-Färbung stattfinden. Demnach bestehen im Einsatz dieser Färbung mehr Vorteile für die praktische Durchführung.

5.3.2 Leberbiopsie

Einige Autoren sprechen von Biopsien, die für die IBD Diagnostik von herausragender Bedeutung und für eine *ante mortem* Diagnose unumgänglich sind (Schumacher et al. 1994, Jacobson 1999, Klingenberg 1999, Jacobson et al. 2001, Garner und Raymond 2004). Dabei erwähnen sie stets auch die Leberbiopsie, da die Einschlusskörperchen u. a. besonders häufig in der Leber vorkommen, und sich dadurch sehr gut zur Probenentnahme und Beurteilung eignet. Isaza et al. (1993) beschrieben die ultraschallgeführte perkutane Leberbiopsie und bewerteten diese Methode als gutes und geeignetes Diagnostikum für sämtliche, die Leber betreffenden Krankheiten. Auch Garner und Raymond (2004) betrachteten sowohl die Keilbiopsie als auch die perkutane Biopsie als beste Methode zur Leberdiagnostik allgemein

und speziell zur IBD Diagnosefindung, da dort häufig Einschlüsse vorgefunden werden. Währenddessen die beiden Autoren eine Biopsie von Pankreas oder Niere als zu invasive Eingriffe ansahen.

Bei der Biopsie unter Sicht hält sich sowohl der zeitliche als auch der technische Aufwand einigermaßen in Grenzen, weil die Tiere unter Isofluran meist schnell in Narkose gehen, stabil sind und keine zusätzlichen Geräte wie z. B. ein Endoskop notwendig sind. In der vorliegenden Arbeit wurde stets eine Coeliotomie durchgeführt, wobei Nadel- und/oder Keilbiopate entnommen wurden. Vereinzelt wurden vor dem Eröffnen der Leibeshöhle zusätzlich perkutane Biopsieversuche unternommen, die aber meist schlechtere Resultate erbrachten und die gewonnenen Gewebeproben zur Beurteilung teils nicht geeignet waren. Der Unterschied zwischen perkutaner Biopsie und Entnahme unter Sicht (ob mit Biopsienadel oder Skalpell) besteht hauptsächlich in der Eröffnung der Coelomhöhle und deren Verschluss. Dies stellt zwar einen zusätzlichen Zeitfaktor dar, der aber eine makroskopische Beurteilung des Organs und eine sichere Kontrolle der u. U. auftretenden Blutung gewährleistet. Die Blutungsneigung der hier untersuchten Tiere war relativ gering. Bei den meisten blieb eine Nachblutung fast völlig aus, was teils an der bestehenden Fettleber liegen könnte. Eine stärkere Blutung trat nur bei wenigen Tieren auf und konnte mittels Druckausübung schnell wieder zum Stillstand gebracht werden. Hinzu kommt bei der Biopsie unter Sicht, dass die beiden großen Blutgefäße der Leber (dorsale Portalvene und ventrale *V. cava*) und deren Verlauf sehr gut zu erkennen sind und auch kleine, oberflächliche Blutgefäße gemieden werden können. Außerdem kann bei einer Gewebeentnahme die Leber besser fixiert werden, um somit bei Bedarf etwas größere Leberstücke mittels Skalpell zu erhalten. Bei der perkutanen Biopsie kann die Beweglichkeit der Leber u. U. hinderlich sein und dadurch in manchen Fällen weniger Gewebe gewonnen werden. Auch bei einer zu dünnen Leber könnte es geschehen, dass durch das Organ gestoßen wird und somit keine Proben herausgestantzt werden können. Unter Umständen werden dabei noch andere Organe verletzt. Beim Einsatz der endoskopischen Biopsieentnahme, wie es Jacobson (1999) und Jacobson (2000) erwähnten, ist die technische Ausrüstung aufwendiger und teurer und kann nicht bei jedem Tier durchgeführt werden, da diese Maßnahme eine bestimmte Mindestgröße des Tieres voraussetzt (Garner und Raymond 2004). Die Schlange muss dafür ebenfalls narkotisiert werden und ein Hautschnitt ist ebenso nötig wie es auch bei einer normalen Coeliotomie der Fall ist, auch wenn der Schnitt beim Endoskopieren etwas kleiner ausfällt. In dieser Untersuchung konnten bei 3 Schlangen die Biopsiewunden in der Sektion beurteilt werden. Dabei stellte sich eine gute Wundheilungstendenz bei den Tieren heraus. Sowohl die

Hautwunden heilten komplikationslos ab als auch die Inzisionswunden in der Leber, die jeweils reizlos vernarbt waren (Abb. 18).

Meines Erachtens ist die Schnelligkeit und Praktikabilität der perkutanen Leberbiopsie, wie sie oft in der Literatur erwähnt wird (Isaza et al. 1993, Gray 2009), nicht vollständig nachvollziehbar. Die Tiere müssen, ob perkutan oder unter Sicht, immer narkotisiert werden. Bei beiden kommt auch der Ultraschall zum Einsatz, um die Leber aufzufinden. Um beurteilbare Gewebestücke gewinnen zu können, ist es vorteilhaft, die Leber zu fixieren, was bei der perkutanen Methode nur bedingt praktikabel ist. Teilweise kann es der Fall sein, dass nur wenig Material gewonnen werden kann und somit nochmals biopsiert werden muss. Unter Sicht kann bei Bedarf ein Keilstück herausgeschnitten werden. Auch die Kontrolle einer möglichen Nachblutung ist bei der perkutanen Methode nicht ausreichend gegeben. Mit der Coeliotomie ist zwar ein bisschen mehr Zeit einzuplanen, doch erscheint mir die Vorgehensweise wesentlich sicherer zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurden Nadel- und/oder Keilbiopsate unter Sicht von insgesamt 19 Tieren entnommen, nach vorheriger sonographischer Darstellung und Lokalisation der Leber. Dabei stellten sich die Keilstücke immer als qualitativ einfacher für die Beurteilung heraus, im Gegensatz zu den Nadelbiopsaten, bei denen vereinzelt kaum geeignetes Gewebe gewonnen werden konnte (2 von 12 Nadelbiopsaten enthielten kein beurteilbares Gewebe). Teilweise musste mit der Nadel auch mehrmals biopsiert werden, um geeignetes Probenmaterial zu gewinnen. Dagegen berichteten Isaza et al. (1993) von guten Resultaten im Hinblick auf die Qualität der Proben. Aufgrund dessen könnte es sich dabei auch um eine Übungssache im Umgang mit Biopsienadeln handeln. Ansonsten ist das gewonnene Nadelbiopsat meist kleiner im Vergleich zum Keilstück, d. h. je kleiner das Stück, desto schwieriger kann es u. U. sein, Einschlüsse zu finden, v. a. wenn diese generell nur vereinzelt im Organ vorhanden sind.

Bezüglich der Färbungsarten bei Organpräparaten stimme ich mit der Aussage von Garner und Raymond (2004) dahingehend überein, dass die Einschlusskörperchen in der Romanowsky-Färbung leichter übersehen werden können, da sie sich darin schlechter anfärben lassen. Auch Jacobson (1999) und Jacobson (2000) bewerteten die HE-Färbung als vorteilhafter gegenüber der Giemsa-Färbung. Bei der HE-Färbung sind die eosinophilen Einschlüsse wesentlich einfacher im Gewebe zu erkennen (Abb. 13-15). Noch anschaulicher erscheinen die eosinophilen Einschlusskörperchen in den sehr dünnen Kunststoffschnitten (Abb. 16, 17). Aufgrund des insgesamt sehr blau wirkenden Gesamtbildes in der Giemsa-Färbung können die basophilen Einschlüsse z. T. schwerer von ihrer Umgebung differenziert

werden (Abb. 18-20). Schumacher et al. (1994), Wozniak et al. (2000) und Raymond et al. (2001) führten bei ihren Präparaten zusätzlich auch eine PAS-Färbung durch, in der sich die Einschlüsse PAS negativ darstellten. Dies konnte in der vorliegenden Untersuchung ebenfalls bei 5 positiven Boas bestätigt werden (Abb. 14, 15).

Bei einer positiven Boa (Nr. 3) wurde eine Nierenbiopsie versucht, da Klingenberg (1999), Blahak (2000) und Jacobson (2000) diese Methode u. a. auch als geeignet für die IBD Diagnosefindung ansahen. Dabei wurde die Niere sonographisch dargestellt, lokalisiert und anschließend bioptiert (zuerst perkutan, dann unter Sicht mit Biopsienadel). Es konnten jeweils gute Proben gewonnen werden. Allerdings schlugen zwei Biopsieversuche bei anderen Boas fehl. Aufgrund des extrem ausgeprägten Fettkörpers war es unmöglich, mit dem Ultraschallgerät die Niere aufzufinden, was anschließend auch unter Sicht nicht gelang. Demnach könnte sich eine Biopsie der Niere generell als schwierig erweisen, sobald der Fettkörper gut ausgebildet ist, und die Nieren darin nicht mehr darstellbar sind. Aber diese vereinzelt Fälle haben keine Aussagekraft für Nierenbiopsien im Allgemeinen. Es sollte nur darauf aufmerksam gemacht werden, dass Nierenbiopsien, wie sie u. a. Klingenberg (1999) und Jacobson (2000) empfehlen, nicht generell problemlos durchgeführt werden können. In der Sektion der oben genannten Boa konnte die Biopsiewunde sowohl an der Haut als auch an der Niere beurteilt werden. Beide Wunden zeigten keine Gewebereaktionen mehr und waren soweit gut verheilt wie es auch bei den Leberbiopsien der Fall war.

5.3.3 Blutausstrich im Vergleich zur Leberbiopsie

In den 9 untersuchten Leberbiopstaten kamen nur vereinzelt Einschlusskörperchen vor, während diese in den Blutausstrichen z. T. in großer Zahl zu finden waren. Das heißt also, dass in diesen Fällen die Ergebnisse der Blutausstriche meist weitaus eindeutiger zu bewerten waren als die positiv beurteilten Leberbiopstate. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass bei einem positiven Blutausstrich nicht zwingend eine Biopsie durchgeführt werden muss und für sich alleine völlig ausreichend sein kann. Insbesondere fielen die zahlreich vorkommenden Einschlüsse zu 100% in den Lymphozyten auf, während in den Erythrozyten meistens viele Einschlusskörperchen vorkamen (10 von 13 positiven Boas). Thrombozyten dagegen wiesen etwas seltener Einschlusskörperchen auf (6 von 13 positiven Boas). Teilweise waren die Einschlüsse aber auch nur vereinzelt zu finden. Auf jeden Fall stimmten jeweils beide Resultate (Blutausstrich + Leberbiopsie) überein und bestätigten sich gegenseitig. Dies gilt zumindest für die hier untersuchten Boas. Bei den Pythons wiederum ist nur bedingt eine

Aussage zu treffen, da bei den beiden positiven Tieren nur eine Sektion, aber keine Leberbiopsie durchführbar war. Nur eine Python wies stark vereinzelt Einschlüsse in den Erythrozyten auf, während bei der anderen im Blutausstrich keine Einschlüsse zu finden waren. Beide zeigten nur ein geringgradiges Vorkommen an Einschlusskörperchen in den verschiedenen Organpräparaten und damit auch in der Leber. Auf das mäßige Vorkommen der Einschlüsse wiesen auch Schumacher (2006) und Keil (2009) hin. Mitchell (2004) vertrat die Meinung, dass Biopsien generell eine geringe Sensitivität aufweisen, d. h. es sind falsch negative Ergebnisse möglich. Dem kann aufgrund der vorliegenden Untersuchungsergebnisse bedingt zugestimmt werden. Wie oben bereits erwähnt, konnten bei den Tieren mit positiv bewertetem Blutausstrich auch in den Leberbiopsaten stets Einschlüsse gefunden werden bzw. bei einer Python ausschließlich in den Sektionspräparaten. Allerdings können diese sehr leicht übersehen werden, sobald sie nur in ggrd. Anzahl vorkommen. Das vereinzelte Auftreten von Einschlüssen in den untersuchten Präparaten war hier stets der Fall. Damit kann sich eine Beurteilung schwierig gestalten und vielleicht nur ein fragliches bzw. verdachtsmäßiges Ergebnis liefern. Unter Umständen kann sich dadurch auch ein falsch negatives Ergebnis herausstellen, wie es Mitchell (2004) bereits in Erwägung zog. Keil (2009) empfiehlt deshalb, verdächtige, aber negativ getestete Tiere, nach einigen Monaten nochmals einer Nachkontrolle zu unterziehen, da sich währenddessen Einschlüsse entwickeln können und die Anzahl tendenziell ansteigt und somit später evtl. besser gefunden werden können. Die vorliegenden Ergebnisse sprechen weitestgehend dafür, dass eine alleinige Beurteilung des Blutausstriches im positiven Fall ausreichend ist. Zur Verifizierung des Ergebnisses kann bei unklaren Befunden durchaus eine Biopsie zusätzlich entnommen werden (Klingenberg 1999).

5.4 Bewertung der Leukozytenzahlen

Im Frühstadium von IBD beobachteten Schumacher et al. (1994), Jacobson (1999), Schumacher (2006) und Jacobson (2007) bei infizierten Schlangen besonders häufig eine Leukozytose ($> 30000-100000/\mu\text{l}$), während sich im weiteren Verlauf teilweise eine Leukopenie ($< 5000/\mu\text{l}$) entwickelte. Eine ausgeprägte Leukozytose ($> 30000/\mu\text{l}$) konnte in dieser Untersuchung allerdings nicht festgestellt werden. Nur wenige Tiere hatten sehr hohe Leukozytenzahlen (höchsten bis $22000/\mu\text{l}$ bei einer positiven Boa; bis $27500/\mu\text{l}$ bei einer negativen Python). Allerdings bleibt hierbei auch zu beachten, dass bei 3 Tieren (2 positive, eine negative Boa) die Leukozytenanzahl 24 Stunden nach der OP und in Ruhe wieder in den Referenzbereich zurückging. Nur eine positive Boa wies weiterhin eine Leukozytose 24

Stunden *post-op* auf. Deshalb kann u. U. davon ausgegangen werden, dass es sich um eine Art Stressleukozytose handeln könnte. Dafür spräche auch das Ergebnis der Blutentnahmen bei einer positiven Boa (Nr. 5). Bei ihr wurde *prä-op*, *post-op* und 24 Stunden nach der Leberbiopsie eine Leukozytenkontrolle durchgeführt. Unmittelbar vor der Operation bestand eine ggrd. Leukozytose (11750/ μ l). Nach dem Eingriff stiegen die Leukozyten weiter an (22000/ μ l), blieben aber noch $< 30000/\mu$ l. Ein Tag nach der Biopsieentnahme lag der Wert im Referenzbereich (7250/ μ l). Selbstverständlich hat dies keine Aussagekraft im Hinblick auf das Vorkommen einer Stressleukozytose. Aber es könnte sich dadurch die Tendenz abzeichnen, dass die Bewertung der Leukozytenzahlen unter Vorbehalt vorzunehmen ist. Um diese Hypothese verifizieren zu können, müsste aber eine umfangreiche Studie durchgeführt werden. Dagegen kamen in dieser Arbeit auch Tiere vor, die als IBD positiv diagnostiziert wurden, deren Leukozytenzahl aber im Referenzbereich lag. Dem gegenüber wiesen negativ beurteilte Tiere z. T. eine Leukozytose auf. Inwiefern ein Zusammenhang zwischen einer Leukozytose und IBD besteht, lässt sich hier nicht aussagekräftig zuordnen. Demnach zeigen also nicht alle IBD positive Tiere eine Auffälligkeit in der Leukozytenzahl (Leukozytose) und können durchaus auch unauffällige Werte aufweisen. Eine Leukopenie konnte in dieser Untersuchung bei keiner Schlange nachgewiesen werden.

5.5 Beurteilung der histopathologischen Befunde

Laut literarischen Angaben wurden in den meisten Organen die pathognomonischen intrazytoplasmatischen Einschlusskörperchen gefunden. So wiesen sämtliche Autoren (Schumacher et al. 1994, Carlisle-Nowak et al. 1998, Oros et al. 1998, Wozniak et al. 2000, Jacobson 2000, Raymond et al. 2001, Jacobson et al. 2001, Vancraeynest et al. 2006, Schumacher 2006, Knotek et al. 2007) die typischen Einschlüsse v. a. in Leber, Pankreas, Niere, Milz, Oesophagus sowie oesophageale Tonsillen, Magen, Darm, Lunge, Gehirn, Rückenmark, aber auch in Herz, Muskulatur, Schilddrüse, Gallenblase und Thymus nach. Diese Befunde decken sich weitestgehend mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit. Mit Ausnahme von Thymus, Herz und Gallenblase konnten in den meisten untersuchten Organen besagte Einschlüsse gefunden werden. Dabei waren die Organe nicht immer gleich betroffen. Besonders häufig (6-7 Tiere) kamen Einschlüsse bei den hier untersuchten 15 positiven Tieren in der Leber, im Pankreas, Niere und Darm vor. Mittelgradig (3-5 Tier) waren die Milz, Lunge, Oesophagus, Magen und Trachea betroffen. Vereinzelt (1-2 Tiere) traten Einschlusskörperchen in der Schilddrüse, Muskulatur, Gehirn und im Hoden auf. Das

Vorkommen der Einschlüsse variierte ebenfalls sowohl in der Anzahl als auch in der Größe von Fall zu Fall. Dies beschrieben auch Schumacher et al. (1994), Jacobson (2000) und Jacobson et al. (2001). Die hier untersuchten Tiere wiesen z. T. in den verschiedenen Organen nur ein vereinzelt Auftreten an Einschlüssen auf (Leber, Pankreas, Milz, Niere, Lunge, Darm, Muskulatur). Dagegen kam in anderen Organen wiederum eine große Menge an Einschlusskörperchen vor (Pankreas, Milz, Niere, Schilddrüse, Lunge, Oesophagus, Magen, Darm, Gehirn, Trachea und Hoden). Speziell bei der im Rahmen der Dissertation untersuchten Leber fiel auf, dass die Einschlüsse in allen 9 Leberbiopaten nur vereinzelt zu finden waren, während in den 7 Lebersektionspräparaten der Boas bis auf eine Ausnahme deutlich Einschlüsse vorkamen. Bei den beiden Pythons hingegen konnten in den Gewebeschnitten generell nur vereinzelt Einschlüsse gefunden werden. Zu diesem Schluss kamen auch Garner und Raymond (2004) und Schumacher (2006), die die Meinung vertraten, dass IBD bei Pythons eher übersehen werden kann, da bei ihnen die Einschlüsse seltener auftreten. Im Vergleich dazu waren bei den Boas meist zahlreiche Einschlusskörperchen vorhanden. Auch bei den hier untersuchten Boas trifft dies weitestgehend zu.

Die hier gefundenen Einschlüsse hatten einen Durchmesser bis über 6 μm (Abb. 8-17). Diese Größenordnung wird auch in den meisten Literaturberichten angegeben. Schumacher et al. (1994) entdeckten Einschlusskörper in den verschiedenen Organen, deren Durchmesser 1-4 μm betragen. Raymond et al. (2001) fanden Einschlusskörperchen, welche einen Durchmesser von bis zu 5 μm aufwiesen. Carlisle-Nowak et al. (1998) sahen Einschlüsse mit einem Durchmesser von 2-10 μm . Vancraeynest et al. (2006) erwähnten sogar Einschlüsse, die einen Durchmesser bis zu 20 μm aufwiesen. Epithelzellen mit Einschlusskörperchen zeigten dabei keinerlei entzündliche Gewebereaktion. Dasselbe beschrieben auch Schumacher et al. (1994), Carlisle-Nowak et al. (1998) und Oros et al. (1998). Jacobson et al. (2001) stellten in ihren Untersuchungen auch eher seltener Entzündungsreaktionen fest. Entzündungszellen konnten nur z. T. in der vorliegenden Untersuchung beobachtet werden (6 positive ohne Heterophile; 9 positive teils mit Heterophilen). Allerdings kamen meist nur milde Entzündungsreaktionen in den betroffenen Organen vor. Dies beschrieben auch Oros et al. (1998) in ihrem Bericht. Teils wiesen die Organe dabei auch keine Einschlüsse auf. Zusätzlich berichteten mehrere Autoren von Zellen mit Einschlusskörperchen, die eine Vakuolisierung des Zytoplasmas aufwiesen, ebenso wie eine Degeneration des Zellkerns (Schumacher et al. 1994, Oros et al. 1998, Wozniak et al. 2000, Raymond et al. 2001, Vancraeynest et al. 2006). Diese Befunde zeigten sich auch bei einigen hier untersuchten Tieren (9 positive, eine negative Boa; 4 negative, 2 positive Pythons). Bei positiven Pythons wird in der Literatur auch von

lymphoplasmazellulären Infiltraten im Gehirn gesprochen (Schumacher et al. 1994, Carlisle-Nowak et al. 1998). Solche Infiltrate wurden bei den beiden hier untersuchten Pythons ebenfalls gefunden.

Insgesamt konnten hier sowohl makroskopisch als auch histologisch keine pathognomonischen Befunde festgestellt werden, die sich ganz spezifisch IBD zuordnen ließen. In dieser vorliegenden Untersuchung fiel besonders häufig eine hepatische Lipidose bei 20 Tiere (13 positiv, 7 negative Schlangen) auf. Dies beobachteten auch Schumacher et al. (1994) und Jacobson et al. (2001) in ihren Studien. Dabei bleibt offen, ob die Fettleber eher alimentär bedingt war oder aber mit der Erkrankung in Zusammenhang steht, da diese bei 13 von 15 positiven Schlangen, v. a. Boas, vorlag. Durch die bestehende Fettleber wurde das Auffinden der Einschlüsse meist erschwert, da teilweise kaum noch intakte Hepatozyten im Präparat vorkamen bzw. das Lebergewebe von den Fettvakuolen verdrängt wurde. Bei einigen der hier durchgeführten Sektionen fiel ein Aszites bei 5 Boas auf (4 positive). Schumacher et al. (1994), Carlisle-Nowak et al. (1998) und Vancraeynest et al. (2006) stellten bei einigen ihrer Schlangen ebenfalls ein Hydroperitoneum fest. Auch von einer Milz- und Pankreasatrophie, v. a. bei Boas, wird in der Literatur berichtet (Schumacher et al. 1994). Dies wurde bei 6 bzw. 2 positiven Boas vorgefunden. Entzündliche Veränderungen in der Lunge, welche auf eine Pneumonie hindeuteten, konnten bei 7 positiven Schlangen festgestellt werden. Auch 2 negative Tiere hatten diesen Befund. Dies wurde ebenfalls in der Literatur von einigen Autoren erwähnt (Schumacher et al. 1994, Oros et al. 1998, Klingenberg 1999, Jacobson et al. 2001, Raymond et al. 2001). Schumacher et al. (1994) stellten in Milz, Pankreas und Thymus fibrotische Veränderungen fest. Bei 4 positiven Boas konnte eine Leberfibrose gefunden werden, während 3 positive noch zusätzlich in anderen Organen eine Fibrose aufwiesen. Nephrotische Auffälligkeiten (weiße Knötchen) kamen bei 5 positiven Schlangen vor. Nierenveränderungen wurden auch von Schumacher et al. (1994) und Raymond et al. (2001) beschrieben. In den verkästen Follikeln einer Boa konnten Salmonellen nachgewiesen werden. Auch Homer (1999) berichtete von einem Salmonellenbefund bei einem IBD positiven Tier.

Inwieweit die beschriebenen Befunde tatsächlich spezifisch für IBD sein sollen, bleibt fraglich.

Des Weiteren wurden noch einige zusätzliche histopathologischen Befunde in der Literatur beschrieben (z. B. Nekrosen, Depletion der Milzlymphozyten), auf die hier nicht weiter eingegangen wird, da sie für diese Arbeit nicht relevant sind und auch nicht weiter beobachtet werden konnten.

5.6 Beuteilung der elektronenmikroskopischen Untersuchung

Die Beobachtungen dieser Untersuchung im Elektronenmikroskop decken sich mit den Befunden von Schumacher et al. (1994) und Jacobson (1999). Die in der Literatur beschriebenen Einschlüsse konnten auch in dieser Arbeit in den positiven Präparaten (Leber, Pankreas, Milz, Niere) gefunden werden (Abb. 19-27). Schumacher et al. (1994) beschrieben sie als elektronendichte, intrazytoplasmatische Einschlüsse, welche v. a. in der Leber, im Pankreas, in der Niere, im Gehirn und Rückenmark gefunden werden konnten. Sie besaßen keine umgebende Membran. Auch Jacobson (2000) nahm an, dass sich die Einschlusskörperchen aus kleinen, elektronendichten Untereinheiten zusammensetzten. Dabei könnte es sich um Ablagerungsmaterial in infizierten Zellen, prävirales Material bzw. Virionen oder um einen zytopathogenen Effekt, verursacht durch das Virus, handeln (Wozniak et al. 2000, Jacobson et al. 2001). Schumacher et al. (1994) erwähnten ebenfalls kleine Strukturen in der Peripherie der Einschlüsse. Diese könnten zur Vergrößerung der Einschlusskörperchen beitragen (Anlagerungsformen). Das lässt sich z. T. auch auf Bildern aus der vorliegenden Untersuchung erkennen (Abb. 23, 27). Der Durchmesser der Einschlüsse betrug ca. 1-4 μm . Auch dies ließ sich in der vorliegenden Arbeit bestätigen. Wozniak et al. (2000) erwähnten sogar Durchmesser bis zu 6 μm . In ihrer Studie beobachteten sie auch, dass während des Krankheitsverlaufes sowohl die Anzahl als auch die Größe der Einschlüsse zunahm. Sie bezeichneten die Einschlusskörperchen als intrazytoplasmatische Ansammlungen eines IBD virusassoziierten Proteins. Auch konnten in der vorliegenden Untersuchung zum Teil hexagonale Virusstrukturen in den Vakuolen innerhalb der Einschlüsse gefunden werden (Abb. 25, 27), die vermuten lassen, dass es sich aufgrund der Morphologie um retrovirale Virionen handelt (Schumacher et al. 1994, Jacobson et al. 2001). In den untersuchten Präparaten stellen sich die Einschlüsse in den Milzlymphozyten besonders eindrucksvoll dar und lassen z. T. erkennen, wie sie den Zellkern eindrücken (Abb. 22, 23). Dadurch könnten u. U. auch Parallelen zu den Einschlüssen in den zirkulierenden Lymphozyten gezogen werden, bei denen teilweise auch die verformten Zellkerne auffallen und das Zytoplasma größtenteils verdrängt wird.

In den Toluidinblau gefärbten Semidünnschnitten kamen die basophilen Einschlüsse besonders gut zur Geltung. Ihr Erscheinungsbild ließ bereits im Lichtmikroskop die z. T. vorhandenen Vakuolen in den Einschlusskörperchen erkennen, welche ebenso im Elektronenmikroskop zu sehen waren. Leider ist die Erstellung solcher Schnitte zu aufwendig

und eignet sich nicht zur Routinediagnostik, auch wenn sich die Einschlusskörperchen hierin besonders eindrucksvoll darstellen.

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Befunde kann letztlich die Schlussfolgerung gezogen werden, dass ein Blutausstrich allein für die Diagnosestellung von IBD im positiven Fall durchaus ausreichend ist. Somit ist eine Leberbiopsie nicht zwingend notwendig. Es sei denn, bei der Beurteilung des Blutausstriches ist kein klarer Befund zu erheben. Dann kann eine Leberbiopsie als nächster Schritt zur Diagnosefindung durchaus hilfreich sein.

Aufgrund der unspezifischen Symptomatik bei IBD sollten bei sämtlichen, in der Praxis vorgestellten Boiden, ein mit DiffQuik gefärbter Blutausstrich als Routinediagnostik durchgeführt bzw. untersucht werden. Durch den geringen Arbeitsaufwand in der Anfertigung, Färbung und Beurteilung der Blutausstriche ist dies heutzutage in den meisten Praxen durchaus möglich.

6 Zusammenfassung

Die Idee zu dieser Dissertation war, ein praktikables und möglichst aussagekräftiges Diagnostikum für den Praxisalltag zu erhalten, um die Einschlusskörperchenerkrankung („Inclusion body disease“, IBD) diagnostizieren zu können. Da keine pathognomonischen Symptome vorliegen und die unterschiedlich ausgeprägte Symptomatik nur einen Hinweis auf IBD liefert, sollte es eine schnell durchführbare Methode geben, mit der einem klinischen Verdacht umgehend nachgegangen werden kann.

Dafür wurden in dieser vorliegenden Arbeit jeweils ein Blutaussstrich und eine Leberbiopsie von 26 Riesenschlangen (17 Boas und 9 Pythons) gewonnen und im Hinblick auf das Vorkommen der typischen Einschlusskörperchen hämatologisch, histologisch und elektronenmikroskopisch untersucht und verglichen. Im Anschluss daran konnten die Tiere entsprechend in IBD positiv oder negativ eingeteilt werden. Durch die Untersuchung stellte sich bei den positiven Tieren heraus, dass ein Blutaussstrich im positiven Fall durchaus für die Diagnosestellung ausreichend ist. Dabei sollte das Augenmerk hauptsächlich auf das Vorhandensein der Einschlüsse in den Lymphozyten gerichtet werden, da diese stets zu finden waren. Aber auch in Erythrozyten und Thrombozyten konnten Einschlüsse nachgewiesen werden, teilweise nur in geringer Menge und in unterschiedlicher Verteilung innerhalb der jeweiligen Blutzellen. Sobald ein unklares Ergebnis vorliegt, sollte weiterführend eine Leberbiopsie zur Verifizierung in Erwägung gezogen werden. Meist konnten nur vereinzelt Einschlusskörperchen in den Hepatozyten gefunden werden. Falls dadurch das Leberbiopat immer noch nicht eindeutig zu beurteilen ist, wird empfohlen, das fragliche Tier nach drei oder vier Monaten nochmals nachzutesten.

Mit dem Blutaussstrich ist der erste Schritt zur Diagnosefindung in der Praxis gegeben, der einen kaum invasiven und relativ schnell durchführbaren Eingriff darstellt. Eine Blutentnahme ist außerdem selbst bei Hausbesuchen ohne großen Aufwand praktikabel. Vielleicht sind die Besitzer dadurch auch eher bereit, ihr Tier vorsorglich auf IBD testen zu lassen.

In der vorliegenden Arbeit kam IBD v. a. bei Boas vor, während mit Ausnahme der Spezies *Python regius* (Königpython) keine weiteren positiven Pythoniden gefunden werden konnten.

7 Summary

Inclusion body disease (IBD) - A comparison of blood smear and liver biopsy with regard to its diagnostic value

The idea for this dissertation was to receive a practicable diagnostic test as significant as possible in order to diagnose the “Inclusion body disease” (IBD) for the daily practice. Because there are no pathognomonic symptoms and the multiple distinct symptomatic delivers only an indication of the disease there should be a rapid practicable method to investigate the clinical suspicion immediately.

In the present thesis a blood smear and a liver biopsy from 26 boid snakes (17 boas and 9 pythons) were sampled and investigated haematologically, histological and electron microscopically on the occurrence of the typical inclusion bodies. Subsequently the animals could be appropriate divided into IBD positively or negatively. During the investigation it turned out with the positive animals that a blood smear is absolutely sufficient in the positive case for the diagnosis of IBD. Besides the attention should be directed mainly on the occurrence of the inclusion bodies inside the lymphocytes, because these were always found. However, inclusions could also be partially detected in erythrocytes and thrombocytes, but in minor quantity and in different distribution within the respective blood cells. Whenever a result is uncertain, a liver biopsy should be taken into consideration for continuing the verification. Mostly only a few inclusion bodies could be found within hepatocytes therefore it is recommended to sample the suspected animal again after three or four months.

With the blood smear the first step is reached to diagnose IBD in practice, and it is a hardly invasive and rather quickly realizable intervention. In addition, taking off blood samples is practicable even during house visits without high investments. It is even possible that the owners are thereby also rather ready to allow testing their animal preventive for IBD.

The investigation in the present thesis demonstrates that IBD seems to be a common disease of boas, whereas only the species *python regius* (ball python) from the Pythonidae could be found as positive for IBD.

8 Literaturverzeichnis

Ahne W (2000):

“Systematische Zoologie“

In: Ahne W, Liebich HG, Stohrer M, Wolf E (eds.): Zoologie
Schattauer Verlag, S. 260-267

Andersen PR, Barbacid M, Tronick SR, Clark HF, Aaronson SA (1979):

”Evolutionary relatedness of viper and primate endogenous retroviruses“
Science, 204: 318-321

Blahak S (2000):

“Virusinfektionen bei Reptilien”

Praktischer Tierarzt 81 (2): 92-112

Büttner M (2007):

“Allgemeine Virologie“

In: Rolle M, Mayr A (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre
Enke Verlag, S. 160-135

Carlisle-Nowak MS, Sullivan N, Carrigan M, Knight C, Ryan C, Jacobson ER (1998):

“Inclusion body disease in two captive australian pythons (*Morelia spilota variegata* and
Morelia spilota spilota)”

Australian Veterinary Journal 76 (2): 98-100

Carneiro SM, Tanaka H, Kisielius JJ, Sesso A (1992):

“Occurrence of retrovirus-like particles in various cellular and intercellular compartments of
the venom glands from *Bothrops jararacussu*”

Research of Veterinary Science 53: 399-401

Chandra AMS, Jacobson ER, Munn J (2001):

“Retroviral particles in neoplasms of burmese pythons (*Python molurus bivittatus*)”

Veterinary Pathology 38: 561-564

Chang L-W, Coleman JK, Chow M, Wozniak E, Green L, Duke D, Jacobson ER (2009):

“Working toward molecular diagnostic test for inclusion body disease” (Abstract)

Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, p. 81

Clark HF, Andersen PR, Lunger PD (1979):

“Propagation and characterization of a C-type virus from a rhabdomyosarcoma of a corn
snake“

Journal of Genetic Virology 43: 673-683

Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (eds.) (1997):

”Retroviruses“

Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S., 1. Auflage

online zugänglich bei NCBI Bookshelf unter: www.ncbi.nlm.nih.gov/books

Fleming GJ, Heard DJ, Jacobson ER, Buergelt C (2003):
“Cytoplasmic inclusions in corn snakes, *Elaphe guttata*, resembling inclusion body disease of
booid snakes”
Journal of Herpetological Medicine and Surgery, 13 (1): 18-22

Fölsch DW, Leloup P (1976):
“Über eine verlustreich verlaufene Infektion in einem Schlangenbestand“
Verhandlungsbericht des 18. Internationalen Symposium über die Erkrankungen der Zootiere
18: 159-165

Frommeyer U und Weinzierl F (2008):
“Klinisch relevante Blutparameter bei Reptilien“
In: Reptilienmedizin Band 6, Fortbildungsveranstaltung der Bayerischen
Landestierärztekammer, Gotteswinter Verlag, München, S. 80-94

Garner MM, Raymond JT (2004):
“Methods for diagnosing inclusion body disease in snakes”
Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, Marples, Florida, May,
pp. 21-25

Gilden RV, Lee YK, Oroszlan S, Walker JL (1970):
”Reptilian C-Typ Virus: Biophysical, Biological and Immunological Properties”
Virology 41 (1): 187-190

Gray DJ (2009):
“Ultrasound-guided liver biopsy in an argentine boa“
Clinician´s Notebook, Exotic DVM 11 (3): 23-24

Hermanns W, Liebig K, Schulz LC (1981):
”Postembedding immunohistochemical demonstration of antigen in experimental polyarthritis
using plastic embedded whole joints”
Histochemistry 73:439–446

Homer BL (1999):
siehe: Jacobson ER, Klingenberg RJ, Homer BL, Mader DR (1999)

Huder JB, Böni J, Hatt J-M, Soldati G, Lutz H, Schüpbach J (2002):
“Identification and characterization of two closely related unclassifiable endogenous
retrovirus in pythons”
Journal of Virology 76 (15): 7607-7615

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2009):
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdB/00.061.1.htm>
<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>

Ippen R, Mladenov Z, Konstantinov A (1978):
“Leukose mit elektronenoptischem Virusnachweis bei zwei Abgottschlangen (*Boa
constrictor*)”,
Schweizer Archiv für Tierheilkunde 120: 357-368

Isaza R, Ackermann N, Schumacher J (1993):
“Ultrasound-guided percutaneous liver biopsy in snakes“
Veterinary Radiology and Ultrasound 34 (6): 452-454

Jacobson ER (1997):
“An Update on Inclusion body disease of boid snakes”
Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, Houston, Texas, Oct.,
p. 165

Jacobson ER (1999):
siehe: Jacobson ER, Klingenberg RJ, Homer BL, Mader DR (1999)

Jacobson ER (2000):
”Reptilian viral diagnostics”
In: Fudge AM (ed.): Laboratory Medicine Avian and Exotic Pets
W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 229-234

Jacobson ER (2007):
“Inclusion body disease of boid snakes”
In: Jacobson ER (ed.): Infectious disease and Pathology of Reptiles
Taylor & Francis Group, London, New York, pp. 389-390

Jacobson ER (2007):
“Viruses and viral disease of reptiles”
In: Jacobson ER (ed.): Infectious disease and Pathology of Reptiles
Taylor & Francis Group, London, New York, pp. 400-412

Jacobson ER, Klingenberg RJ, Homer BL, Mader DR (1999):
“Inclusion body disease: roundable discussion“
Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, 9 (2): 18-25

Jacobson ER, Oros J, Tucker SJ, Pollock PD, Kelley KL, Munn RJ, Lock BA, Mergia A,
Yamamoto JK (2001):
“Partial characterization of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease”
American Journal of Veterinary Research 62 (2): 217-224

Jacobson ER, Samuelson DA (2007):
“Identifying Pathogens in Cells and Tissues”; “Viruses“
In: Jacobson ER (ed.): Infectious Diseases and Pathology of Reptiles
Taylor & Francis Group, pp. 307-311

Jacobson ER, Tucker S, Oros J, Pollock D, Yamamoto JK, Vaughn K, Munn RJ, Lock B
(1999):
“Studies with retroviruses isolated from Boa constrictors, *Boa constrictor*, with inclusion
body disease” (Abstract)
Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, pp. 5-6

Keil R (2009):
<http://www.schlangenwelt.de/krankheiten/ibd.htm>

Klingenberg RL (1999):

siehe: Jacobson ER, Klingenberg RJ, Homer BL, Mader DR (1999)

Knotek Z, Jekl V, Dorrestein GM, Blahak S, Knotkova Z (2007):

“Presumptive viral infections in captive populations of *boa constrictor* in the Czech Republic”

Veterinarni Medicina 52 (11): 512-520

Laboklin (2010):

http://www.laboklin.de/pages/html/de/VetInfo/aktuell/lab_akt_0801.htm

Levine BS (2002):

“Use of nucleoside reverse transcriptase inhibitors in a boa constrictor, *Boa constrictor constrictor*, with boid inclusion body disease”

Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, Reno, Nevada, Oct., pp. 59-61

Liebermann H (1992):

”Retroviridae”

In: Liebermann H (Hrsg): Lehrbuch der veterinärmedizinischen Virologie
Gustav Fischer Verlag, S. 152-294

Liebermann H, Wittmann W (1987):

“Eigenschaften und Taxonomie der Retroviren (Übersichtsreferat)“

Monatsheft für Veterinärmedizin 42: 853-858

Lock BA, Green LG, Jacobson ER, Klein PA (2003):

“Use of an ELISA for detection of antibody responses in argentine boa constrictors (*Boa constrictor occidentalis*) “

American Journal of Veterinary Research 64 (4): 388-395

Lock BA, Jacobson ER (2005):

“Use of an ELISA to survey exposure of wild caught boa constrictors, *Boa constrictor*, to retroviruses isolated from boids with inclusion body disease”

Journal of Herpetological Medicine and Surgery 15 (2): 4-7

Lunger PD, Clark HF (1973):

“Ultrastructural studies of cell-virus interaction in reptilian cell lines. I. Intramitochondrial viruses in “C”-type virus-producing VSW cells”

Journal of National Cancer Institute 50: 111-117

Lunger PD, Hardy WD, Clark HF (1974):

“C-type virus particles in a reptilian tumor”

Journal of National Cancer Institute 52: 1231-1235

Mader DR (1999):

siehe: Jacobson ER, Klingenberg RJ, Homer BL, Mader DR (1999)

Marschang RE (2004):
“Inclusion body disease”

In: Girling SJ, Raiti P (eds.): Manual of reptiles
British Small Animal Veterinary Association, Second Edition, Gloucester, UK
S. 336-337

Marschang RE, Hetzel U, Schwartz D, Michling R, Matthes K (2001):

“Isolation of viruses from boa constrictors (*Boa constrictor spp.*) with inclusion body disease in Europe“ (Abstract)

Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, pp. 30-33

Marschang RE, Michling R, Benkö M, Papp T, Harrach B, Böhm R (2003):

“Evidence for wide-spread Atadenovirus infection among snakes“

6th International Congress of Veterinary Virology, Saint-Malo, France, p. 152

Mattison C (1999):

“Die Schlangen-Enzyklopädie“, Dr. Lohmann M (Übersetzer)

BLV Verlagsgesellschaft mbH, München, S. 145-186

Mayr A (2007):

“Grundlagen der Allgemeinen Medizinischen Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre“

In: Rolle M., Mayr A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre

Enke Verlag, S. 16-17

Mayr A, Kaaden O-R (2007):

“Viruskrankheiten der Tiere“

In: Rolle M., Mayr A. (Hrsg.): Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre

Enke Verlag, S. 160-135

Mitchell M (2004):

”Viral disease”

In: Fowler ME, Miller RE (eds.): Zoo and Wild Animal Medicine

W.B. Saunders Company, Philadelphia, 5. Edition

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

”Type A-like retroviral particles in a metastatic intestinal adenocarcinoma in an emerald tree
boa (*Corallus caninus*) “

Veterinary Pathology 41: 515-518

Oros J, Tucker S, Jacobson ER (1998):

“Inclusion body disease in two captive boas in the canary islands“

Veterinary Record 143: 283-285

Pschyrembel (2002):

“Klinisches Wörterbuch“

259. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, S. 594

- Raymond JT, Garner MM, Nordhausen RW, Jacobson ER (2001):
“A disease resembling inclusion body disease of boid snakes in captive palm vipers (*Bothriechis marchi*)”
Journal of Veterinary Diagnosis and Investigation 13: 82-86
- Ritchie B (2006):
“Virology“
In: Mader DR (ed.): Reptile Medicine and Surgery
W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 391-392, 404-407
- Romeis B (1989):
“Färben der Schnitte“
In: Böck P (Hrsg.): Mikroskopische Technik
Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 17. Auflage
S. 213-218, 232-236, 247-248
- Romeis B (1989):
“Herstellung und Untersuchung unfixierter Präparate“
In: Böck P (Hrsg.): Mikroskopische Technik
Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 17. Auflage, S. 28-35
- Romeis B (1989):
“Organische Substanzen“
In: Böck P (Hrsg.): Mikroskopische Technik
Urban und Schwarzenberg München, Wien, Baltimore, 17. Auflage, S. 472-275
- Schilliger L, Selleri P, Frye FL (2002):
“Lymphoreticular neoplasia in a red-tail boa, *Boa constrictor constrictor*, accompanied by I.B.D.-like inclusion bodies”
Bulletin of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians, Reno, Nevada, Oct.
p. 65
- Schumacher J (2006):
“Inclusion body disease virus“
In: Mader DR (ed.): Reptile Medicine and Surgery
W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 836-840
- Schumacher J, Jacobson ER, Homer BL, Gaskin JM (1994):
“Inclusion body disease in boid snakes”
Journal of Zoo and Wildlife Medicine 25: 511-520
- Vancraeynest D, Pasmans F, Martel A, Chiers K, Meulemans G, Mast J, Zwart P, Ducatella R (2006):
“Inclusion body disease in snakes: a review and description of three cases in *boa constrictor* in belgium”
Veterinary Record 158 (22): 757-760
- Wellehan JFX, Johnson AJ (2005):
”Reptile Virology“
Veterinary Clinics of North America Exotic Animal Practice 8 (1): 27-52

- West G, Garner M, Raymond J, Latimer KS, Nordhausen R (2001):
"Meningoencephalitis in a Boelen's Python (*Morelia boeleni*) associated with PMV Infection"
Journal of Zoo and Wildlife Medicine 32 (3): 360-365
- Wozniak E, McBride J, DeNardo D, Tarara R, Wong V, Osburn B (2000):
"Isolation and characterization of an antigenetically distinct 68-kd protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in boa constrictors, chronically infected with the IBD virus"
Veterinary Pathology 37: 449-459
- Zeigel RF, Clark HF (1969):
"Electron microscopic observations on a "C"-type virus in cell cultures derived from a tumor-bearing viper"
Journal of National Cancer Institute 43 (5): 1097-1102
- Zeigel RF, Clark HF (1971):
"Histologic and electron microscopic observations on a tumor-bearing viper: Establishment of a "C"-type virus-producing cell line"
Journal of National Cancer Institute 46: 309-321
- Zschesche W, Konstantinov A, Ippen R, Mladenov Z (1988):
"Lymphoid leukemia with presence of type C-virus particles in a four-lined chicken snake (*Elaphe obsoleta quadrivittata*)"
Verhandlungsbericht des 30. Internationalen Symposiums über die Erkrankungen der Zoo- und Wildtiere 30: 275-278

Danksagung

Zu aller erst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. El-Matbouli für die Übernahme meiner Dissertation bedanken und für seine Unterstützung während dieser Arbeit.

Meinen herzlichen Dank spreche ich auch Frau Dr. Ilina Bühler aus, die mir dieses Dissertationsthema vorgeschlagen hat und mich bei meiner praktischen Arbeit sehr unterstützte. Auch für ihr geduldiges Korrekturlesen bin ich ihr dankbar.

Im Besonderen gilt mein Dank auch allen Mitarbeitern der Klinik für Fische und Reptilien und der Reptilien-Auffangstation für die unkomplizierte und hilfreiche Zusammenarbeit. Insbesondere danke ich Frau Christine Kühnhauser-Vogt, die mich sehr gut und geduldig in die Labortätigkeiten eingearbeitet hat und mir stets hilfreich zur Hand ging. Auch bei Herrn Daniel Grabner bedanke ich mich für die Unterstützung in der Bearbeitung meiner histologischen Proben. Mein Extradank gilt Dr. Gunnar Dembek, der mich stets motivierte und mir in sämtlichen Fragen weiterhalf.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Hermanns bedanken, der es mir freundlicherweise ermöglichte, einige meiner Proben zu bearbeiten, diese in Kunststoff einzubetten und zuzuschneiden. Auch den Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie danke ich sehr für ihre bereitwillige Hilfestellung im Endspurt meiner Dissertation, insbesondere auch Frau Siebert und Dr. Andreas Blutke.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Sauter-Louis, die mir in den statistischen Fragen eine sehr große Hilfe war.

Zu guter Letzt danke ich ganz besonders meiner Familie und meinem Freund für ihren Beistand und ihre Geduld. Mein Dank gilt auch meinen guten Freunden für deren Anteilnahme und deren Zuspruch.