

Aus dem Institut für
Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Dr. habil. R. Hoffmann

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. Dr. habil. W. Ahne

ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON IRIDOVIREN

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

von
Dipl. Biol. Dr. rer. nat. Frank Just
aus Memmingen

München 2003

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Ahne
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. H. Eisgruber

Tag der Promotion: 18. Juli 2003

In der vorliegenden Arbeit möchte ich von der Möglichkeit Gebrauch machen, die Dissertation kumulativ zu gestalten (§ 6 Abs. 2 der novellierten Promotionsordnung für die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 01.01.2003). Die Ergebnisteile I und II sind bereits als englischsprachige Publikationen in „*Journal of Invertebrate Pathology*“ bzw. „*Journal of Veterinary Medicine B*“ erschienen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Aufgabenstellung	1
2. Einführung (Schrifttum)	4
2.1 Taxonomie der Familie <i>IRIDOVIRIDAE</i>	4
2.2 Morphologie, Zusammensetzung und physikalisch-chemische Eigenschaften von Iridoviren	10
2.3 Virusreplikation	13
2.4 Zur Biologie der Iridoviren	15
2.4.1 Bei Invertebraten vorkommende Iridoviren	15
2.4.1.1 Die Gattung <i>Iridovirus</i>	15
2.4.1.1.1 <i>Invertebrate iridescent virus 1 (IIV-1)</i>	17
2.4.1.1.2 <i>Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6)</i>	18
2.4.1.2 Die Gattung <i>Chloriridovirus - Invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3)</i>	20
2.4.2 Bei Vertebraten vorkommende Iridoviren	21
2.4.2.1 Die Gattung <i>Ranavirus</i>	22
2.4.2.1.1 <i>Frog virus 3 (FV-3)</i>	22
2.4.2.1.2 Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status	23
2.4.2.2 Die Gattung <i>Lymphocystivirus</i>	25
2.4.2.2.1 <i>Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1)</i>	25
2.4.2.2.2 Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status (LCDV-2)	26
3. Eigene Untersuchungen – Publikationen	27
3.1 Ergebnisse – Teil I	27
F. T. Just, S. S. Essbauer: Characterization of an Iridescent Virus isolated from <i>Gryllus bimaculatus</i> (Orthoptera: Gryllidae). <i>Journal of Invertebrate Pathology</i> 77 : 51-61 (2001)	
3.2 Ergebnisse – Teil II	39
F. Just, S. Essbauer, W. Ahne, S. Blahak: Occurrence of an Invertebrate Iridescent-Like Virus (<i>Iridoviridae</i>) in Reptiles. <i>Journal of Veterinary Medicine B</i> 48 : 685 – 694 (2001)	
4. Zusammenfassende Diskussion	50
5. Zusammenfassung	57
6. Summary	58
7. Literaturverzeichnis	59
Danksagungen	68

1. Einleitung und Aufgabenstellung

Für gewöhnlich beginnen Dissertationen unserer tiermedizinischen Fakultät formal richtig mit einem kurzen Kapitel mit dem Titel „Einleitung und Aufgabenstellung“. In einem solchen Kapitel gibt der Kandidat einen knappen Überblick über ein selbst oder von einem Dozenten ausgewähltes Teilgebiet der modernen Tiermedizin. Auf wenigen Seiten wird dann das Augenmerk auf die Lückenhaftigkeit unseres Wissens in diesem Bereich gelenkt und eine wissenschaftliche Fragestellung herausgearbeitet, deren Bearbeitung lohnenswert erscheint und die Anfertigung der Dissertation begründet. Das Aufspüren von Wissenslücken, die Formulierung von Fragestellungen, die Auswahl geeigneter experimenteller Methoden, die Planung und Durchführung von Experimenten, sowie deren Auswertung und kritische Bewertung stellen die allgemein anerkannte, und somit korrekte Vorgehensweise für jeden Wissenschaftler dar und die Anfertigung der Dissertation ist der Nachweis für die Befähigung zu wissenschaftlicher Arbeit.

Die vorliegende Arbeit ist insofern anders, als sie nicht mit einem Kandidaten, einem Plan und einem vorgefertigten Dissertationsthema beginnt. Sie ist vielmehr ein Beispiel dafür, dass die Natur selbst – in Kombination mit der zufälligen Entdeckung von Phänomenen – offene Fragen von wissenschaftlichem Interesse stellt. Sie beweist, dass der einfache, vielleicht sogar zunächst wissenschaftlich naive, spielerische Umgang mit Natur, begründet auf die klassisch naive menschliche Neugier, der Ausgangspunkt für wissenschaftliches Arbeiten sein kann und (sofern einem Promotionskandidaten an dieser Stelle bereits eine wissenschaftstheoretische Bewertung erlaubt ist) vielleicht sogar auch sein sollte. Neugier, die durch das positive Erlebnis von Entdeckung belohnt wird, weckt weitere Neugier und stellt vermutlich das wichtigste Grundnahrungsmittel für wissenschaftliche Forschung dar.

Der Grundstein für diese Arbeit war zunächst keine geplante, gezielte Untersuchung eines bekannten Phänomens, sondern schlicht ein klassischer Zufallsbefund. Der Verfasser versuchte sich seinen Lebensunterhalt im Zweitstudium Tiermedizin mit seinem Wissen aus dem Erststudium, als Elektronenmikroskopiker und Entomologe zu verdienen. Er fand eine solche Möglichkeit in einem Labor, das sich mit der Virologie wechselwarmer Wirbeltiere beschäftigte und arbeitete fortan als entomologisch geprägter, auf morphologische Methoden ausgerichteter Dienstleister zwischen gestandenen Molekularbiologen und Virologen mit

tiermedizinischen Fragestellungen. Der Zufall wollte es, dass die Liebe zur Entomologie und seine Neugier ihn zuweilen auf scheinbare Abwege aus der tiermedizinischen Relevanz führte. So fixierte er eines Tages verschiedene Gewebe von Mittelmeergrillen (*Gryllus bimaculatus*), die er in einem nahen Geschäft als Tiernahrung (lebendes Reptilienfutter) gekauft hatte und die seiner Meinung nach verhaltensauffällig und zeitweise ataktisch in ihren Bewegungen waren. So entstand der Zufallsbefund: eine erste, noch wenig perfekte, elektronenmikroskopische Aufnahme von icosaedrischen Viruspartikeln in einer Fettzelle einer Grille (Abb. 1):

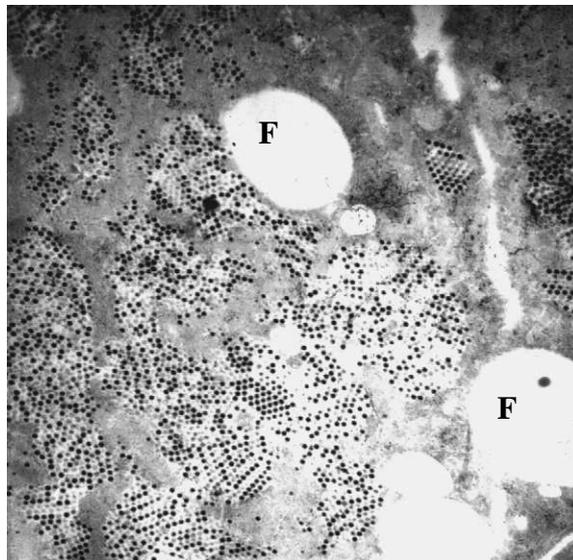


Abb.1. *Gryllus bimaculatus*, transmissions-elektronenmikroskopische Aufnahme, Ausschnitt aus einer Fettzelle, Fettkörper des Kopfes. Ansammlungen von icosaedrischen Viruspartikeln im Zytoplasma. F – präparationsbedingt herausgelöste Fettröpfchen. Primärvergrößerung: x 4 400

Dieser Befund schien interessant, doch veterinärmedizinisch ohne Belang. Dennoch verlangte die Klarheit des Befundes nach einer wissenschaftlich korrekten Ausarbeitung. Nachdem aber alle gekauften Grillen für die Elektronenmikroskopie aufgearbeitet worden waren, stand kein Material für die Virusisolierung zur Verfügung. Es begann eine mehrere Monate dauernde Suche nach einem schon verloren geglaubten Pathogen, bis es schließlich gelang, den Zufallsbefund in weiteren Exemplaren von *Gryllus bimaculatus* aus dem freien Futtertierhandel zu reproduzieren. Die weitere Aufgabenstellung bestand nun darin, das Virus zu isolieren und zu charakterisieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen, die den ersten Teil

der hier vorliegenden Arbeit bilden, führten zu einer Veröffentlichung über ein Insekten-Iridovirus (Just und Essbauer, 2001), die für sich alleine genommen, vermutlich immer noch keine Dissertation an einer Tiermedizinischen Fakultät wert gewesen wäre. Handelte sie doch von Tieren und Pathogenen, die in der tierärztlichen Praxis eine völlig untergeordnete Rolle spielen. Im gleichen Zeitraum wurden jedoch vom Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold vier neue Virusisolate aus insectivoren Reptilien zur näheren Charakterisierung an unser Labor geschickt, deren Charakteristika auf den ersten Blick erstaunliche Übereinstimmungen mit dem aus den Mittelmeergrillen gewonnenen Isolat aufwiesen. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich deshalb mit einem Vergleich dieser Isolate mit dem ursprünglichen Isolat aus *Gryllus bimaculatus* (Just et al., 2001).

2. Einführung (Schrifttum)

2.1 Taxonomie der Familie *IRIDOVIRIDAE*

Die Familie *Iridoviridae* umfasst in vier etablierten Genera sog. „große“ (120-380 nm) icosaedrische Viren mit linearer, doppelsträngiger DNA. Viren der Gattungen *Iridovirus* und *Chloriridovirus* haben nach bisheriger Auffassung ausschließlich Invertebratenwirte, während Iridoviren der Gattungen *Ranavirus* und *Lymphocystivirus* ausschließlich aus poikilothermen Vertebraten (Fischen, Amphibien und Reptilien) isoliert wurden (Williams et al., 2000). Neben einer vergleichsweise überschaubaren Anzahl von etablierten Virusspezies enthält die Familie eine Vielzahl von vorläufig zugeordneten Isolaten mit unklarer systematischer Stellung, die insbesondere die taxonomische Struktur innerhalb der Gattungen *Iridovirus* und *Ranavirus* erheblich kompliziert.

Die meisten der Isolate der Gattungen *Iridovirus* und *Chloriridovirus* wurden in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entdeckt und leider nur unvollständig charakterisiert, weil die heute hierzu verwendeten molekularbiologischen Techniken (s.u.) noch nicht zur Verfügung standen. Viele Isolate wurden nicht in allgemein zugänglichen Sammlungen hinterlegt und gelten als verschollen, so dass fehlende molekularbiologische Untersuchungen zu den Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb der Gattungen nicht mehr nachzuholen sind. Bereits die Namensgebung für die einzelnen Isolate gibt bis heute immer wieder Grund zur Verwirrung. Verschiedene Systeme zur Benennung haben sich nebeneinander gehalten, wodurch es zur Einführung einer großen Zahl von Synonymen und Abkürzungen für einzelne Isolate kam. Ursprünglich wurden alle Isolate mit dem Gattungsnamen des Invertebratenwirts, gefolgt von der Bezeichnung „*iridescent virus*“ - wie z. B. in „*Aedes iridescent virus*“ - benannt. Schon bald jedoch nahm die Zahl der bekannten Isolate stark zu und aus ein und derselben Wirtsgattung wurden mehrere Isolate gewonnen (Williams, 1996). So waren im obigen Beispiel bereits 1970 fünf *iridescent viruses* aus *Aedes spec.* bekannt und die gültigen Nomenklaturregeln mussten überarbeitet werden.

Nach einem Vorschlag von Tinsley & Kelly (1970) ging man in der Folgezeit dazu über, die Isolate nach der chronologischen Reihenfolge ihrer Entdeckung zu nummerieren, und als „*Invertebrate Iridescent Virus - Nr. (IIV-Nr.)*“ zu benennen. Bei der großen Zahl der Isolate war es jedoch nur für den Spezialisten offensichtlich, dass sich hinter resultierenden Kürzeln

wie beispielsweise „IIV-3“ ein *iridescent virus* aus *Aedes taeniorhynchus* verbarg. Deshalb hielten sich bis heute auch die ursprünglichen Bezeichnungen weiter. Verwirrender war noch, dass man die Nummerierung der Isolate über Gattungsgrenzen hinweg verwendete (vgl. Tab. 4, S. 16). So gehören die Isolate IIV-1 und IIV-2 zur Gattung *Iridovirus*, IIV-3 bis IIV-5 zur Gattung *Chloriridovirus*, IIV-6 dagegen wieder zu *Iridovirus*, usw.

Nachdem die Invertebraten-Iridoviren zum Teil ein sehr weites Wirtsspektrum haben und gleichzeitig mehrere verschiedene Iridoviren die gleiche Wirtsspezies befallen können, wurde in neuerer Zeit von Williams & Cory (1994) der Vorschlag unterbreitet, die Benennung von Iridoviren vollkommen von dem Namen der jeweils betroffenen Wirtsspezies zu trennen. Stattdessen sollten die Isolate mit dem Namen ihres geographischen Ursprungs benannt werden, wie es auch für die Taxonomie anderer Virusfamilien (Reoviridae, Bunyaviridae, Rhabdoviridae, usw.) vorgeschrieben ist (Williams, 1996). Das Virus aus unserem Beispiel mit den bisherigen Namen „*Invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3)*“, „Mosquito iridescent virus (MIV)“, und „*Aedes taeniorhynchus iridescent virus*“ würde demnach als „Vero Beach iridescent virus“ eindeutig zu bezeichnen sein. Dieser Vorschlag hat sich bis heute jedoch nicht allgemein durchgesetzt, so dass weiterhin alle Namensgebungen im Gebrauch sind.

Die Benennung und Einteilung von Iridoviren wird heute von dem „International Committee on Taxonomy of Viruses“ (ICTV) festgelegt und veröffentlicht (Williams et al., 2000). Allgemein gültig ist, dass die offiziellen Namen anerkannter Virus-Spezies – wie Gattungs- und Familiennamen - stets kursiv zu schreiben sind (in unserem Beispiel ist dies also der Name „*Invertebrate iridescent virus 3*“). Mit dem Begriff „*iridescent virus*“, werden Iridoviren der Invertebraten bezeichnet. Der Begriff *Iridovirus*, in der nicht kursiv geschriebenen Form, bezeichnet allgemeiner alle Angehörigen der Familie *Iridoviridae*.

Zur Speziesdifferenzierung innerhalb der Gattung *Iridovirus* werden nach den Regeln des ICTV vor allem molekularbiologische Kriterien herangezogen:

- Die Gensequenz des Haupt-Kapsid-Proteins (major capsid protein, MCP) oder dessen Aminosäuresequenz. Die Aminosäuresequenzen des gesamten Proteins zweier distinkter Virusspezies dürfen nicht mehr als 90 % Identität aufweisen.

- Standardisierte DNA-DNA dot-blot Hybridisierungen. Die DNA zweier distinkter Virusspezies dürfen Hybridisierungswerte von 50 % nicht überschreiten (Williams and Cory, 1994).
- DNA-Restriktionsfragment-Längenprofile. Die Profile von distinkten Virusspezies müssen für vier ausgewählte Restriktions-Endonukleasen völlig voneinander verschieden sein.

Bislang ist nur von einer der beiden Spezies der Gattung, von *Invertebrate iridescent virus 6* (IIV-6), das gesamte Genom sequenziert worden (Jakob et al., 2001). Für die Nutzung dieser Daten zur Abgrenzung möglicher neuer Virusspezies oder der Überarbeitung der Systems in Bezug auf „alte“ Isolate, liegen bis heute noch keine allgemein akzeptierten Richtlinien vor, sind in der Zukunft aber zu erwarten.

Innerhalb der Gattung *Ranavirus* werden zur Speziesdifferenzierung bislang Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen (RFLP), Virale Protein-Profile, DNA Sequenzanalysen (insbesondere des MCP-Gens), serologische Kreuzreaktivität und die Wirtsspezies herangezogen.

Eine Übersicht über die derzeit gültige systematische Struktur der Familie *Iridoviridae* geben die Tabellen 1 bis 3, die dem 7. Taxonomiebericht des ICTV entnommen sind (Williams et al., 2000). Es ist zu berücksichtigen, dass in dem derzeit gültigen System, aus Mangel an Daten über verschollene oder unzureichend charakterisierte Isolate, nicht alle aus der Literatur bekannten Iridoviren aufgenommen wurden.

Das derzeit gültige System erwähnt demnach folgende, noch von Williams (1996) der Gattung *Iridovirus* zugeordneten Isolate nicht mehr:

Pterostrictus madidus iridescent virus	(IIV-17)	(Robertson, unpublished)
Odontria striata iridescent virus	(IIV-19)	(Kalmakoff, unpublished)
Simocephalus expinosus iridescent virus	(IIV-20)	(Federici & Hazard, 1975)
Tipula spec. iridescent virus	(IIV-25)	(Elliott, et al., 1977)
Ephemopteran iridescent virus	(IIV-26)	(Federici, unpublished)
Nereis diversicolor iridescent virus	(IIV-27)	(Devauchelle, 1977)

Tabelle 1.
Übersicht über die Gattung *Iridovirus* (Williams et al., 2000)

GENUS IRIDOVIRUS**Spezies**

<i>Invertebrate iridescent virus 1</i>	(IIV-1)
(Tipula iridescent virus)	
<i>Invertebrate iridescent virus 6</i>	(IIV-6)
(Chilo iridescent virus)	

Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status

Anticarsia gemmatalis iridescent virus	(AGIV)
Invertebrate iridescent virus 2	(IIV-2)
(Sericesthis iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 9	(IIV-9)
(Invertebrate iridescent virus 10)	(IIV-10)
(Invertebrate iridescent virus 18)	(IIV-18)
(Opogonia iridescent virus)	
(Wiseana iridescent virus)	
(Witlesia iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 16	(IIV-16)
(Costelytra zealandica iridescent virus)	
(Invertebrate iridescent virus 21)	(IIV-21)
(Heliothis armigera iridescent virus)	
(Insect iridescent virus 28)	(IIV-28)
(Lethocerus columbinae iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 22	(IIV-22)
(Simulium sp. iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 23	(IIV-23)
(Black beetle iridescent virus)	
(Heteronychus arator iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 24	(IIV-24)
(Apis iridescent virus)	
(Bee iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 29	(IIV-29)
(Tenebrio molitor iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 30	(IIV-30)
(Heliothis/Helicoverpa zea iridescent virus)	
Invertebrate iridescent virus 31	(IIV-31)
(Armadillidium vulgare iridescent virus)	
(Isopod iridescent virus)	
(Porcellio dilatatus iridescent virus)	
(Invertebrate iridescent virus 32)	(IIV-32)

Namen der anerkannten Virus-Spezies kursiv
 Synonyme und Abkürzungen in Klammern

Ebenso werden innerhalb der Gattung *Chloriridovirus* nicht mehr berücksichtigt:

Aedes cantans iridescent virus	(IIV-4)	(Weiser, 1965)
Aedes annulipes iridescent virus	(IIV-5)	(Weiser, 1965)
Simulium ornatum iridescent virus	(IIV-7)	(Weiser, 1968)
Culicoides sp. iridescent virus	(IIV-8)	(Chapman et al., 1968)
Aedes stimulans iridescent virus	(IIV-11)	(Anderson, 1970)
Aedes cantans iridescent virus	(IIV-12)	(Tinsley et al., 1971)
Corethrella brakeleyi iridescent virus	(IIV-13)	(Chapman et al., 1971)
Aedes detritus iridescent virus	(IIV-14)	(Hasan et al., 1970)
Aedes detritus iridescent virus	(IIV-15)	(Vago et al., 1969)
Chironomus plumosus iridescent virus		

Tabelle 2.

Übersicht über die Gattung *Chloriridovirus* (Williams et al., 2000)

GENUS *CHLORIRIDOVIRUS*

Spezies

Invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3)
 (Aedes taeniorhynchus iridescent virus)
 (Mosquito iridescent virus)

Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status

Keine

Namen der anerkannten Virus-Spezies kursiv
 Synonyme und Abkürzungen in Klammern

Tabelle 3.

Übersicht über die Gattungen *Ranavirus* und *Lymphocystivirus* (Williams et al., 2000)**GENUS RANAVIRUS****Spezies**

<i>Frog virus 3</i>	(FV-3)
(Box turtle virus 3)	(TV-3)
(Lucké triturus virus 1)	(LT-1)
(Tadpole edema virus)	(TEV)
(Tortoise virus 5)	(TV-5)

Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status

Bohle iridovirus	(BIV)
Epizootic haematopoietic necrosis virus	(EHNV)
(Rainbow trout virus)	(RTV)
(Redfin perch virus)	(RFPV)
Redwood Park virus	(RPV)
(Tadpole virus 2)	
(Stickleback virus)	(SBV)
Regina ranavirus	(RRV)
(Tiger salamander virus)	
(Ambystoma tigrinum stebbensi virus)	(ATV)
Santee-Cooper ranavirus	(SCRV)
(Largemouth bass virus)	(LMBV)
(Doctor fish virus)	(DFV)
(Guppy virus 6)	(GV-6)

GENUS LYMPHOCYSTIVIRUS**Spezies**

<i>Lymphocystis disease virus 1</i>	(LCDV-1)
(Flounder lymphocystis disease virus)	(FDLV)
(Flounder virus)	

Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status

Lymphocystis disease virus 2	(LCDV-2)
(Dab lymphocystis disease virus)	

Namen der anerkannten Virus-Spezies kursiv
Synonyme und Abkürzungen in Klammern

2.2 Morphologie, Zusammensetzung und physikalisch-chemische Eigenschaften von Iridoviren

Die Virionen der Iridoviren sind Icosaeder mit einem Durchmesser von 120 bis 380 nm. Das Nucleocapsid besteht aus einem langen, aufgewundenen Nukleoproteinstrang, der sich im Elektronenmikroskop als homogenes elektronendichtes Material darstellt. Er ist umgeben von einer Lipidmembran, die von „Transmembranpartikeln“ unbekannter Funktion durchzogen wird (Williams et al., 2000). Die Lipidmembran legt sich dem icosaedrischen Capsid auf seiner Innenseite an (Stoltz, 1971; Kelly und Vance, 1973). Das Capsid selbst besteht aus identischen Capsomeren von 6-7 nm Durchmesser und 7-13 nm Höhe. Jedes Capsomer besteht seinerseits aus einem inneren und einem äußeren Protein-Trimer. Von dem Capsid gehen meist kurze Fibrillen aus. Eine Umhüllung reifer Viruspartikel mit einer äußeren Lipidhülle findet offenbar nicht zwingend statt. Sie wurde unregelmäßig bei Iridoviren mit Wirbeltierwirten und bei in Zellkultur gezüchteten Invertebraten-Iridoviren beobachtet (Williams et al., 2000). Die Behüllung ist für die Infektiosität der Partikel nicht erforderlich. Abb. 2 illustriert schematisch den Aufbau von Iridoviren:

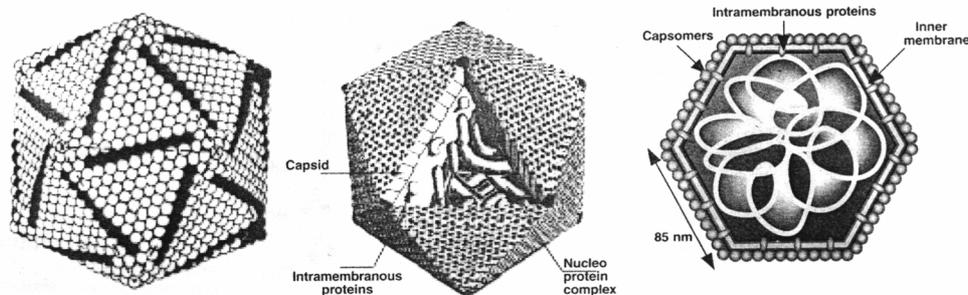


Abb.2 (nach Williams et al., 2000): *Links:* Äußere Hülle von Invertebrate iridescent virus 2 (IIV-2) mit 1562 Capsomeren; *Mitte:* Capsid-Symmetrie von *Frog Virus 3* (FV-3); *Rechts:* Der schematische Querschnitt durch ein Virion von *Frog Virus 3* (FV-3) zeigt den filamentösen Nukleoprotein-Kern umgeben von einer Lipiddoppelmembran mit Transmembranproteinen und den Capsomeren, die dem Capsid die Form eines Icosaeders verleihen.

Die Virionen sind in Wasser über lange Zeit stabil (Martinez et al., 2003). Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) bleibt bei 15 °C in destilliertem Wasser über 97 Tage infektiös (Langdon 1989). Die Sensitivität der Virionen gegenüber dem pH-Wert und UV-

Bestrahlung variiert innerhalb der Familie. *Frog Virus 3 (FV-3)* wird durch UV-Bestrahlung von 150 mJ inaktiviert. Alle Iridoviren werden bei einer Temperatur von 55°C innerhalb von 15 bis 30 min inaktiviert.

Die lineare, doppelsträngige **DNA** besitzt eine Länge von 140-303 kbp und hat einen Anteil von 12-16 % am Molekulargewicht der Viruspartikel. Der GC-Gehalt beträgt 28 bis 54 %. Die DNA ist circular permutiert und besitzt terminal redundante Anteile, die 5-50 % des Gesamtgenoms ausmachen können (Goorha und Murti, 1982; Williams et al., 2000; Jakob et al., 2001). Ähnliche Verhältnisse finden sich auch bei Bakteriophagen, wie z.B. *Enterobacteria phage T4* bzw. *Enterobacteria phage P22*. Bei Viren der Gattungen *Ranavirus* und *Lymphocystivirus* liegt die DNA in stark methylierter Form vor, während Viren der Gattungen *Iridovirus* und *Chloriridovirus* unmethylierte DNA aufweisen (Williams et al., 2000). Für die Methylierung der DNA an Cytosin-Guanin-Dinukleotiden wird eine Virus-codierte Methyl-Transferase verantwortlich gemacht (Willis und Granoff, 1980; Goorha und Murti, 1982; Wagner et al., 1985).

Mit Hilfe der zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) können bis zu 36 verschiedene iridovirale **Proteine** mit Molekulargewichten von 10-250 kDa aufgetrennt werden. Darunter befinden sich Virion-assoziierte Enzymaktivitäten wie eine Proteinkinase, eine Nukleotid-Phospho-Hydrolase, Ribonuklease (RNase), Desoxyribonuklease (DNase) und eine Protein-Phosphatase. Bei *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6)* wurden darüber hinaus bislang 6 DNA assoziierte Polypeptide identifiziert. Unter den viralen Strukturproteinen dominiert das major capsid protein (MCP) mit einem Anteil von 40-50 % am Gesamtproteingehalt der Partikel (Mao et al., 1996) und einem Molekulargewicht zwischen 48 und 50 kDa. Die gesamte Aminosäuresequenz des Proteins ist für einige Iridoviren bekannt und MCP-spezifische Primer und Protokolle für Polymerase-Kettenreaktions-Experimente (PCR) werden zur Identifizierung und Abgrenzung von Iridoviren aller Gattungen eingesetzt (Mao et al., 1997; 1999; Webby und Kalmakoff, 1998). Die Aminosäuresequenz des MCP der Iridoviren ist innerhalb der Familie hoch konserviert und zeigt zudem Homologien zu Strukturproteinen von *African swine fever virus (Asfarviridae)* und *Paramecium bursaria Chlorella virus 1 (Phycodnaviridae)* (Tidona et al., 1998; Pringle, 1999; Williams et al., 2000).

Durch die komplette Sequenzierung von Genomen einzelner Iridoviruspezies (LCDV-1, IIV-6, ATV, FV-3, ...) und dem Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenzen mit Protein-Datenbanken wurden in neuerer Zeit eine ganze Reihe weiterer Proteine identifiziert. Hierzu gehören z. B. zwei Untereinheiten der DNAabhängigen RNA-Polymerase II, DNA-Polymerase, Zinkfinger-Proteine, eine Helikase, eine GTP Phospho-Hydrolase, Thymidin-Kinase, Cytosin DNA Methyl-Transferase, u. a. (Williams et al., 2000; Jakob et al., 2001). Das Genom von *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6)* enthält 468 offene Leserahmen (open reading frames, ORF) mit viralen Genprodukten von 40 bis 2432 Aminosäuren. Ungefähr 50 % der Leserahmen sind nicht überlappend, so dass die Kodierungskapazität des Genoms bei mehr als 200 Proteinen liegt (Jakob et al., 2001).

Unbehüllte Viruspartikel haben einen **Lipidgehalt** von 5 bis 17 %, wobei Phospholipide überwiegen. Die Zusammensetzung der Lipide unterscheidet sich signifikant von der Lipidzusammensetzung der Wirtszellmembranen, woraus geschlossen wird, dass die viralen Lipide während der Virusvermehrung *de novo* synthetisiert werden und nicht aus der Zytoplasmamembran des Wirts stammen (Kelly und Vance, 1973; Williams et al., 2000).

2.3 Virusreplikation

Der Replikationszyklus von Iridoviren wurde hauptsächlich anhand der Typspezies der Gattung *Ranavirus*, *Frog virus 3 (FV-3)*, untersucht (Goorha, 1982; Goorha und Murti, 1982). Die Virionen gelangen entweder über rezeptorvermittelte Endozytose oder durch Penetration der Zytoplasmamembran in die Wirtszelle. Im ersten Fall finden sich kurzzeitig behüllte Partikel im Zytoplasma, im zweiten Fall unbehüllte. Nach dem Verlust aller die Nukleinsäure umhüllenden Elemente (engl.: „uncoating“, Rolle und Mayr, 2002) erfolgt der Transport der viralen DNA in den Zellkern. Ein Virion-assoziiertes Protein bewirkt direkt nach der Infektion der Zelle die Abschaltung der wirtseigenen Biosynthese von Makromolekülen. Weitere Virion-assoziierte Proteine aktivieren in einem bislang kaum verstandenen Prozess die wirtseigene RNA-Polymerase II und führen zur Synthese von sog. „immediate early (IE)“ bzw. „delayed early (DE)“ Transkripten, wobei das virale Genom als Matrize fungiert. Genprodukte dieser Transkripte sind sowohl regulatorisch als auch katalytisch wirksame Proteine. Eines dieser Proteine ist die virale DNA-Polymerase, die den ersten Schritt der viralen DNA-Synthese katalysiert. Dabei dient das virale „Eltern-Genom“ als Matrize und es wird virale Vorläufer-DNA von ein bis zwei Genomlängen synthetisiert. (Chinchar et al., in Vorb.) Diese neuen DNA-Moleküle dienen als Vorlagen für weitere Syntheszyklen oder gelangen direkt in das Zytoplasma, wo der zweite Schritt der DNA-Synthese erfolgt (Williams et al., 2000).

Im zweiten Schritt bilden sich in Analogie zur Replikation bei „T-even“-Bakteriophagen sog. „DNA-Konkatamere“, also lange DNA-Moleküle mit mehreren aufeinander folgenden vollständigen Virus-Genomen, die in der Folge zu Genom-Monomeren prozessiert werden, die „terminal redundant“ und „circular permutiert“ sind (Luria et al., 1978; Goorha, 1982; Goorha und Murti, 1982; Delius et al., 1984; Williams et al., 2000). Bei der Verbindung von einzelnen DNA-Molekülen zu längeren Ketten sind stark redundante Endabschnitte (engl.: „terminal redundancy“) des Genoms beteiligt, bei denen ein gewisser Prozentsatz des Virusgenoms als Wiederholung vorausgehender Genomabschnitte vorliegt (Luria et al., 1978). Einen schematischen Überblick über die Bildung von Konkatameren bei der Replikation von Bakteriophagen gibt Abb. 3.

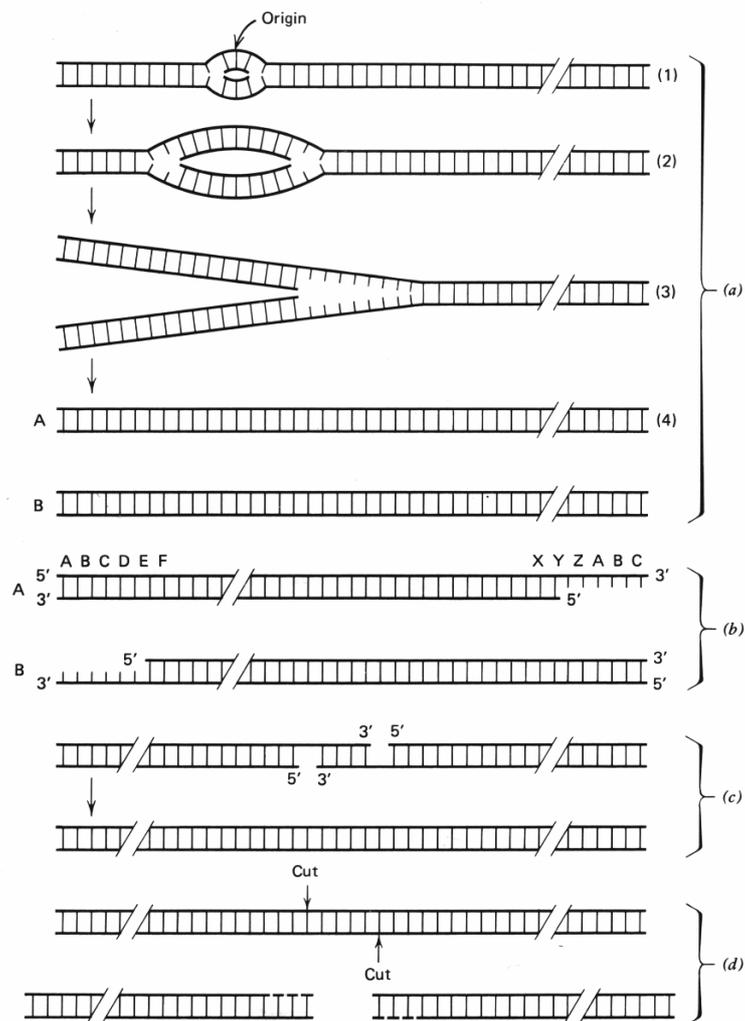


Abb.3 (nach Luria et al., 1978) Bildungsmechanismus von Konkatalamern bei der Replikation von Bakteriophagen-DNA mit redundanten Endabschnitten. (a) Primärer Replikationszyklus mit bidirektionaler Synthese von einem Ursprung aus. Die Enden der beiden Tochtermoleküle A und B sind in (b) detailliert gezeichnet; (c) Zwei DNA-Moleküle bilden ein Dimer. Die lückenhaften Übergänge werden durch DNA-Polymerasen und DNA-Ligasen geschlossen; (d) Die langen Konkatalamere werden durch Endonukleasen in Monomere mit redundanten Enden geschnitten

Ebenfalls im Zytoplasma erfolgt die Synthese von „late“ (L) Transkripten, deren Genprodukte an der Bildung der Viruspartikel beteiligt sind. Die DNA von Iridoviren der Gattungen *Ranavirus* und *Lymphocystivirus* wird im Zytoplasma mit Hilfe einer Virus-codierten Methyl-Transferase methyliert und schließlich in die Capside verpackt. Während des Verpackungsprozesses werden in Analogie zu den Verhältnissen bei Bakteriophagen (*Enterobacteriophage* T4, bzw. P22) die Konkatalamere zu reifen Virusgenomen zugeschnitten (Goorha, 1982) und im Sinne des sog. „headful-mechanism“ verpackt. Die daran beteiligten DNA-Nukleasen

schneiden die DNA-Stränge dabei nicht an einer spezifischen Schnittstelle, sondern zufällig, nach Erreichen einer bestimmten DNA-Moleküllänge. Dies führt dazu, dass jedes zu verpackende DNA-Molekül einen anderen Satz von Gensequenzen als terminal redundancy enthält. Dieses Phänomen wird als „circular permutation“ bezeichnet (Luria et al., 1978).

Die Freisetzung von reifen Viruspartikeln erfolgt schließlich durch Knospung (engl.: „budding“) an der Zellmembran oder durch Lyse der Wirtszelle. Dadurch können sowohl behüllte, als auch unbehüllte Viruspartikel auftreten.

2.4 Zur Biologie der Iridoviren

2.4.1 Bei Invertebraten vorkommende Iridoviren

2.4.1.1 Die Gattung *Iridovirus*

Der Gattung *Iridovirus* werden heute mehr als 30 Virusisolate mit natürlichen Wirten aus sieben verschiedenen Invertebratenklassen zugeordnet. Viele dieser Isolate wurden jedoch nie ausreichend charakterisiert und gelten als verschollen, so dass von einigen Isolaten außer der bloßen Beschreibung ihrer Isolierung und der Angabe der Wirtsspezies keine weiteren Daten vorliegen (Williams, 1996). Eine Übersicht über die Vielzahl von Isolaten gibt Tabelle 4. Die Mehrzahl der Viren wurde in den 70er und 80er Jahren des letzten Jahrhunderts aus Insekten gewonnen. Weitere Isolate fanden sich bei Schnecken (Gastropoda, O: Basommatophora [Wasserlungenschnecken]), Muscheln (Bivalvia, O: Filibranchiata [Fadenkiemer]), Wasserflöhen (Crustacea, O: Diplostraca), Asseln (Crustacea, O: Isopoda), parasitisch in Asseln lebenden Nematoden (Nematoda, O: Trichosyringida), höheren Krebsen (Crustacea, O: Decapoda), parasitischen Milben (Arachnida, O: Acari) und schließlich bei marinen Würmern (Polychaeta, O: Phyllodocida). Allgemein lässt sich eine Affinität zu Wirten aus aquatischen oder zumindest feuchten Habitaten feststellen (Williams et al., 2000).

Der Gattungsname „*Iridovirus*“, geht auf die charakteristische, bläulich-violette oder grün schillernde Färbung systemisch infizierter Wirte zurück. Durch Ultrazentrifugation hochangereicherte Virus-Pellets zeigen bei schrägem Lichteinfall die gleiche „irisierende“ Färbung. Allerdings ist dieses Phänomen nicht bei allen Iridovirus-Isolaten gleich gut erkenn-

Tabelle 4.

Übersicht über Virusisolate der Gattungen *Iridovirus* und *Chloriridovirus* (nach Kelly, 1985)

Isolat	Wirtsspezies	Ordnung	Klasse	Fundort	(Referenz)
IIV-1	<i>Tipula paludosa</i>	Diptera	Insecta	UK	(Xeros, 1954)
IIV-2	<i>Sericesthis paludosa</i>	Coleoptera	Insecta	Australien	(Steinh. & Leutenegger, 1963)
IIV-3	<i>Aedes taeniorhynchus</i>	Diptera	Insecta	Florida, USA	(Clark et al., 1965)
IIV-4	<i>Aedes cantans</i>	Diptera	Insecta	-	(Weiser, 1965)
IIV-5	<i>Aedes annulipes</i>	Diptera	Insecta	-	(Weiser, 1965)
IIV-6	<i>Chilo suppressalis</i>	Lepidoptera	Insecta	Japan	(Fukaya & Nasu, 1966)
IIV-7	<i>Simulium ornatum</i>	Diptera	Insecta	Tschechoslowakei	(Weiser, 1968)
IIV-8	<i>Culicoides sp.</i>	Diptera	Insecta	Louisiana, USA	(Chapman et al., 1968)
IIV-9	<i>Wiseana cervinata</i>	Lepidoptera	Insecta	Neuseeland	(Fowler & Robertson, 1972)
IIV-10	<i>Witlesia sabulosella</i>	Lepidoptera	Insecta	Neuseeland	(Fowler & Robertson, 1972)
IIV-11	<i>Aedes stimulans</i>	Diptera	Insecta	USA	(Anderson, 1970)
IIV-12	<i>Aedes cantans</i>	Diptera	Insecta	Kent, UK	(Tinsley et al., 1971)
IIV-13	<i>Corethrella brakeleyi</i>	Diptera	Insecta	Louisiana, USA	(Chapman et al., 1971)
IIV-14	<i>Aedes detritus</i>	Diptera	Insecta	Frankreich	(Hasan et al., 1970)
IIV-15	<i>Aedes detritus</i>	Diptera	Insecta	Afrika	(Vago et al., 1969)
IIV-16	<i>Costelytra zealandica</i>	Coleoptera	Insecta	Neuseeland	(Kalmakoff, 1972)
IIV-17	<i>Pterostichus madidus</i>	Coleoptera	Insecta	-	(Robertson, unpublished)
IIV-18	<i>Opogonia spec.</i>	Lepidoptera	Insecta	-	(Kelly & Avery, 1974)
IIV-19	<i>Odontria striata</i>	Coleoptera	Insecta	-	(Kalmakoff, unpublished)
IIV-20	<i>Simocephalus expinosus</i>	Diplostraca	Crustacea	Florida, USA	(Federici & Hazard, 1975)
IIV-21	<i>Heliothis armigera</i>	Lepidoptera	Insecta	Afrika	(Carey et al., 1978)
IIV-22	<i>Simulium spec.</i>	Diptera	Insecta	Wales, UK	(Batson & Johnston, 1976)
IIV-23	<i>Heteronychus arator</i>	Coleoptera	Insecta	Afrika	(Carey et al., 1978)
IIV-24	<i>Apis cerana</i>	Hymenoptera	Insecta	Kashmir, Indien	(Bailey et al., 1976)
IIV-25	<i>Tipula spec.</i>	Diptera	Insecta	Surrey, UK	(Elliott, et al., 1977)
IIV-26	“Mayfly”	Ephemeroptera	Insecta	-	(Federici, unpublished)
IIV-27	<i>Nereis diversicolor</i>	Phyllodocida	Polychaeta	-	(Devauchelle, 1977)
IIV-28	<i>Lethocerus columbiae</i>	Heteroptera	Insecta	Afrika	(Carey et al., 1978)
IIV-29	<i>Tenebrio molitor</i>	Coleoptera	Insecta	Colorado, USA	(Kelly et al., 1979)
IIV-30	<i>Heliothis zea</i>	Lepidoptera	Insecta	-	(Sikorowski, unpublished)
IIV-31	<i>Armadillidium vulgare</i>	Isopoda	Crustacea	Kalifornien, USA	(Federici, 1980)
IIV-31	<i>Thaumamermis cosgrovei</i>	Trichosyringida	Nematoda	Kalifornien, USA	(Poinar et al., 1980)
IIV-32	<i>Porcellio dilatatus</i>	Isopoda	Crustacea	Kalifornien, USA	(Federici, 1980)
(-)	<i>Crassostraea gigas</i>	Filibranchiata	Bivalvia	-	(Comps & Bonami, 1977)
(-)	<i>Lymnaea truncatula</i>	Basommatophora	Gastropoda	-	(Barthe et al., 1984)
(-)	<i>Scapteriscus vicinus</i>	Orthoptera	Insecta	Brasilien	(Boucias et al., 1987)
(-)	<i>Protrachypene precipua</i>	Decapoda	Crustacea	Equador	(Lightner & Redman, 1993)
MdILV	<i>Macropipus depurator</i>	Decapoda	Crustacea	Frankreich	(Montanie et al., 1993)
(-)	<i>Popillia japonica</i>	Coleoptera	Insecta	Portugal, Azoren	(Lacey & Adams, 1994)
AGIV	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Lepidoptera	Insecta	Argentinien	(Kinard et al., 1995)
(-)	<i>Varroa jacobsoni</i>	Acari	Arachnida	USA	(Camazine & Liu, 1998)
CrIV	<i>Gryllus campestris</i>	Orthoptera	Insecta	Holland	(Kleespies et al., 1999)
CrIV	<i>Acheta domesticus</i>	Orthoptera	Insecta	Holland	(Kleespies et al., 1999)
(-)	<i>Culicoides variipennis</i>	Diptera	Insecta	Kalifornien, USA	(Mullens et al., 1999)
(-)	<i>Ecdyonurus torrentis</i>	Ephemeroptera	Insecta	Tschechoslowakei	(Tonka & Weiser, 2000)
GbIV	<i>Gryllus bimaculatus</i>	Orthoptera	Insecta	Deutschland	(Just & Essbauer, 2001)

Isolatnamen (soweit möglich) nach dem Nomenklaturvorschlag von Tinsley & Kelly (1970)

AGIV: *Anticarsia gemmatalis* iridescent virus; CrIV: Cricket iridescent Virus; GbIV: *Gryllus bimaculatus* iridescent virus; IIV: Invertebrate Iridescent Virus; MdILV: *Macropipus depurator* irido-like virus

bar (Williams & Smith, 1957; Kelly, 1985; Williams et al., 2000).

Neben letalen, teilweise epidemisch auftretenden Erkrankungen in einzelnen Wirtsspezies (Fowler, 1989; Hernández et al., 2000) lösen „iridescent viruses“ im Freiland häufig auch nicht-letale und klinisch inapparente Infektionen aus (Williams et al., 2000; López et al., 2002; Martinez et al., 2003). Die Virusübertragung (bislang nur bei Insekten und Asseln untersucht) erfolgt nach bisherigen Erkenntnissen nicht transovariell, sondern horizontal, i.d.R. durch Kannibalismus oder das Fressen von infizierter Beute (Williams et al., 2000). Daneben sind auch Übertragungen durch Endo- und Ektoparasiten möglich (Hess & Poinar, 1985; López et al., 2002). Iridoviren sind weltweit verbreitet (Williams et al., 2000).

2.4.1.1.1 *Invertebrate iridescent virus 1 (IIV-1)*

1954 führte Claude Rivers in Cambridge Feldstudien über das kurz davor entdeckte „Hämozyten-Polyhedrosisvirus“ bei Schnaken (*Tipula paludosa*, Diptera, F: Tipulidae) durch und entdeckte dabei in Kleingewässern Fliegenlarven, die durch ihre Epidermis hindurch eine merkwürdig bläulich irisierende Färbung zeigten (Williams, 1996). Die Untersuchung dieser Larven im Labor führte zur Erstbeschreibung eines Iridovirus durch Xeros (1954) in der Zeitschrift „*Nature*“ und löste einen Boom in der Invertebratenvirus-Forschung aus.

Das zunächst als *Tipula iridescent virus* (TIV) bezeichnete Virus (zur Nomenklatur, siehe S.4) befiel vor allem den Fettkörper der Fliegenlarven und löste dort das im Detail bei Xeros (1954) wie folgt beschriebene Farbphänomen aus: „*The intact infected animal may be recognized in strong sunlight, when the fat body appears purple through the wetted skin. In the course of the disease the lobules of the fat body distend enormously and the tissue becomes nodular. The nodules are orange in transmitted light and iridescent, purple, blue, green, etc., in reflected light. The animals, when moribund, become purplish-white in colour with the disruption of diseased fat cells and the liberation of their contents into the blood. Death occurs two to four weeks or more after the disease becomes detectable.*“ Die Prävalenz für diese letale Erkrankung bei Fliegenlarvenpopulationen in England bezifferte Xeros mit 15 %. Die Virulenz des neuen Erregers lag damit unter der des Polyhedrosevirus der Schmetterlinge (Xeros, 1954).

In der folgenden Zeit wurde *IIV-1* eingehender charakterisiert und sein breites Wirtsspektrum innerhalb der Insekten in Infektionsexperimenten nachgewiesen (Williams & Smith, 1957, Hukuhara, 1964, Xeros, 1964a, b). *IIV-1* wurde bis heute in verschiedenen Labors erhalten und neuere, molekularbiologische Daten liegen vor, wodurch der Speziesstatus begründet werden kann (Williams et al., 2000).

2.4.1.1.2 *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6)*

IIV-6 (Syn.: *Chilo iridescent virus*) ist wohl das am besten untersuchte Iridovirus bei Invertebraten und stellt die Typspezies der Gattung dar (Williams et al., 2000). Das Virus wurde 1964 aus Larven des Pflanzenschädling *Chilo suppressalis* WALKER (Lepidoptera, F: *Pyralidae* [Zünsler]) in Japan isoliert. Bereits bei der ersten Anzucht des Virus in im Labor aufgezogenen Schmetterlingslarven, machte man von der horizontalen Übertragung durch Verfütterung von virushaltigem Material Gebrauch (Fukaya & Nasu, 1966). 16 % der so behandelten Larven zeigten innerhalb von 20 Tagen die für Iridovirusinfektionen charakteristische, irisierende Verfärbung. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass wie bei *IIV-1* das Fettgewebe der Insekten der Hauptmanifestationsort der Virusvermehrung war.

Zur Untersuchung des Wirtsspektrums von *IIV-6* wurde neben der Virusübertragung per os, vor allem die direkte Verimpfung von Virusmaterial in das Haemocoel von Insekten experimentell genutzt. Auf diese Weise ließen sich bislang über 100 Insektenspezies, darunter auch eine Vielzahl landwirtschaftlich bedeutender Pflanzenschädlinge, mit dem Virus infizieren (Devauchelle et al., 1985). Eine Reihe von Forschern beschäftigt sich seither mit der (nicht unumstrittenen) Frage, in wieweit *IIV-6* im Rahmen biologischer Schädlings-Bekämpfung eingesetzt werden kann (Kleespies et al., 1999; Funk et al., 2000; Jakob et al., 2002). Neuere Untersuchungen hierzu belegen beispielsweise, dass *IIV-6* unter Labor- und Freilandbedingungen durch Schlupfwespen (Hymenoptera, F: *Ichneumonidae*) auf verschiedene Wirte übertragen und damit in Ökosystemen verbreitet werden kann (López et al., 2002). Neben der hohen Tenazität der Iridoviren im Freiland und dem breiten Wirtsspektrum von *IIV-6*, spricht auch diese Beobachtung gegen einen vorschnellen und unüberlegten Einsatz des Virus zur biologischen Schädlingsbekämpfung, da hierbei ein nicht unbedeutendes Risiko für Nutzinsekten eines Ökosystems angenommen werden muss. Experimentell lässt sich *IIV-6* nicht nur in Insekten, sondern auch in anderen Arthropoden,

wie Asseln (Crustacea, O: Isopoda) und Hundertfüßern (Chilopoda), vermehren (Ohba & Aizawa, 1979). Infektionsversuche bei Wirbeltieren verliefen dagegen bislang erfolglos (Devauchelle et al., 1985).

In vitro lässt sich *IIV-6* auf einer Vielzahl von Insekten-Zelllinien, bei einer Optimaltemperatur von 21 °C, vermehren. Ebenfalls empfänglich ist eine Reptilienzelllinie (Viper spleen cells, VSW) bei 28 °C (McIntosh & Kimura, 1974). Bei 37°C findet keine Virusreplikation in Wirbeltierzelllinien statt (Cerutti & Devauchelle, 1980; Kelly & Robertson, 1973). Säugetierzelllinien sind nach bisherigen Erkenntnissen unempfindlich gegen *IIV-6* (Devauchelle et al., 1985).

In neuerer Zeit wurde *IIV-6* als Modellorganismus für die Gruppe der „iridescent viruses“ ausgiebig mit molekularbiologischen Techniken untersucht. Details des Replikationszyklus, wie die Unterdrückung der wirtszelleigenen Biosynthese von Makromolekülen (Cerutti and Devauchelle, 1980) oder der zeitliche Verlauf der Transkription viraler Gene (D'Costa et al., 2001), wurden intensiver untersucht. Demnach sind bei der Replikation von *IIV-6* mindestens 38 immediate-early (IE), 34 delayed-early (DE), und 65 late (L) Transkripte beteiligt (vgl. Kap. 2.3, S. 13). Eine virale Helicase und eine RNA-Polymerase gehören zu den IE-Transkripten, während das major capsid protein (MCP) zu den L-Transkripten gehört (D'Costa et al., 2001). Die Identifizierung verschiedener virusassoziierter Enzymaktivitäten und Strukturproteine (Monnier & Devauchelle, 1976) in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts ging Untersuchungen zur Genomorganisation voraus (Bahr et al., 1997; Delius et al., 1984), die die nahe Verwandtschaft zwischen den Iridoviren der Invertebraten und der Vertebraten belegten.

Der bedeutendste Fortschritt in der molekularbiologischen Erforschung der „iridescent viruses“ gelang im Jahr 2001 durch die Sequenzierung des gesamten Genoms von *IIV-6* (Jakob et al., 2001). Die Untersuchung verdeutlichte die mit 234 open reading frames (ORFs), im Vergleich mit anderen Virusfamilien, große Kodierungskapazität der Invertebraten-Iridoviren (vgl. auch S. 12). Mit Hilfe der zur Verfügung stehenden Datenbanken wurde bis heute eine Vielzahl von Proteinen identifiziert und damit eine wichtige Voraussetzung für zukünftige Untersuchungen zur Biologie der Iridovirus-Replikation und zur virologischen Grundlagenforschung geschaffen. Durch die detaillierte Kenntnis der Genomorganisation

eröffnen sich wichtige Möglichkeiten für die taxonomische Eingruppierung neuer und noch zur Verfügung stehender „alter“ *Iridovirus*-Isolate. Abschließend muss jedoch bemerkt werden, dass neben der heute ständig wachsenden Zahl molekularbiologischer Daten, unsere Kenntnisse über ökologische und epidemiologische Aspekte der von *IIV-6* induzierten Erkrankungen in der Natur und in Insektenzuchten noch weitgehend lückenhaft sind.

2.4.1.2 Die Gattung *Chloriridovirus* - *Invertebrate iridescent virus 3 (IIV-3)*

Die Gattung *Chloriridovirus* vereinigte früher mehr als ein halbes Dutzend Virusisolate (vgl. S. 8), die alle aus Dipterenpezies mit aquatischen Larvenstadien, vor allem aus Mücken, gewonnen wurden (Clark et al., 1965; Weiser, 1965; 1968; Vago et al., 1969; Hasan et al., 1970; Chapman et al., 1971; Tinsley et al., 1971; Williams et al., 2000). Das Wirtsspektrum der Chloriridoviren erscheint damit erheblich schmaler als das anderer „iridescent viruses“ (Williams et al., 2000). Nur eins der zahlreichen Isolate, *Invertebrate iridescent virus 3* (Syn.: Mosquito iridescent virus, *Aedes taeniorhynchus iridescent virus*), wurde ausreichend charakterisiert um als Spezies eingestuft werden zu können. Von anderen Isolaten liegen entweder keine molekularbiologischen Daten vor oder sie erwiesen sich als Stämme von *IIV-3*.

Chloriridoviren sind mit ca. 180 nm (gemessen in Ultradünnschnitten) deutlich größer als die Vertreter der Gattung *Iridovirus*, die 120 - 130 nm (150 nm) erreichen; der taxonomische Wert dieses Merkmals ist jedoch unsicher (Williams et al., 2000). Die Virionen haben mit $2.49 - 2.75 \times 10^9$ Da in etwa das doppelte Molekulargewicht, und mit 4440 – 4460 S etwa den doppelten Sedimentationskoeffizienten von Iridoviren der Gattung *Iridovirus*. Die Genomgröße von *IIV-3* wird mit 135 kbp angegeben, die Kodierkapazität liegt bei ca. 100 Proteinen. Das Genom von *IIV-3* ist bislang nur unvollständig sequenziert worden. Identifiziert wurden bislang eine Untereinheit der DNA-Polymerase und das major capsid protein. Serologisch lässt sich *IIV-3* deutlich von anderen Iridoviren abgrenzen (Williams et al., 2000).

Im Gegensatz zu den Verhältnissen bei anderen Invertebrateniridoviren wird für *IIV-3* eine transovarielle Übertragung angenommen. Daneben kommen aber auch horizontale Übertragungen durch Kannibalismus oder räuberische Nahrungsaufnahme bei Mückenlarven

vor. Eier experimentell (per os) infizierter Mückenweibchen können zu nahezu 100 % infiziert sein und die schlüpfenden Larven sterben vor ihrer vierten Häutung ab (Linley & Nielsen, 1968 a; b). Die gleiche Studie ergab, dass per os infizierte Junglarven in der Regel schnell Anzeichen einer Erkrankung zeigten (irisierende Färbung) und vor ihrer Verpuppung starben. Je später in der Larvalentwicklung die experimentelle Infektion erfolgte, desto länger war die Inkubationszeit. Unabhängig vom Zeitpunkt der Infektion starben die Larven immer im 4. Larvalstadium. Die Infektionsraten per os infizierter Larven waren von der applizierten Virusdosis abhängig, lagen aber meist deutlich unter 10 % (Linley & Nielsen, 1968 a; b).

Ökologische und Epidemiologische Aspekte von *Chloriridovirus*-Infektionen bei Invertebraten sind nur unzureichend untersucht.

2.4.2 Bei Vertebraten vorkommende Iridoviren

Bislang sind die Vertebrateniridoviren nur aus sog. „niederen Vertebraten“, also aus Fischen, Amphibien und Reptilien, isoliert worden. Als Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen Invertebraten- und Vertebrateniridoviren gilt, neben dem Wirtsspektrum, der Methylierungsgrad viraler DNA. Während die DNA von Vertretern der Gattungen *Iridovirus* und *Chloriridovirus* nicht oder nur schwach methyliert ist, sind bei Vertebrateniridoviren fast alle „CpG“ Dinukleotide viraler DNA methyliert (Williams et al., 2000).

Wie für die Invertebrateniridoviren gilt auch für die Iridoviren der Vertebraten, dass die meisten Isolate noch unzureichend charakterisiert sind und die taxonomische Eingruppierung etliche Unsicherheiten enthält. Das International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) berücksichtigt deshalb in seinem Taxonomiereport viele der beschriebenen Isolate gar nicht oder bezeichnet sie als „tentative species“, also als vorläufig zuzuordnende Virenspezies mit unsicherem taxonomischen Status (Williams et al., 2000). Die folgenden Ausführungen beschränken sich (bis auf Ausnahmen) auf die von dem ICTV in seinem 7. Taxonomiereport aufgeführten Iridoviren. Darüber hinausgehende Informationen finden sich bei Essbauer & Ahne (2001).

2.4.2.1 Die Gattung *Ranavirus*

2.4.2.1.1 *Frog virus 3 (FV-3)*

Frog virus 3 (Syn.: Box turtle virus 3; Lucké triturus virus 1; Tadpole edema virus; Tortoise virus 5) ist das einzige Virusisolat mit gesichertem Spezies-Status innerhalb der Gattung *Ranavirus*. *FV-3* wurde 1965 in Nordamerika aus Fröschen (*Rana pipiens*) mit Nierencarcinomen isoliert (Granoff et al., 1965). Diese sog. „Lucké-Tumore“ werden durch das Ranid Herpesvirus-1 (RaHV-1) hervorgerufen und sind häufig, zusätzlich zu RaHV-1, mit anderen Viren vergesellschaftet (Lunger et al., 1965). *FV-3* ist nicht für adulte Frösche und Kröten, aber für deren schlupffreie Embryos und Kaulquappen pathogen (Tweedell & Granoff, 1968; Granoff, 1989). Symptome der Erkrankungen sind ausgedehnte Ödeme und Hämorrhagien der Haut. Experimentell infizierte junge Kröten (*Bufo fowleri*) zeigten nach intraperitonealer Injektion von 5×10^4 PFU *FV-3* eine Mortalität von 62.5 % (Came et al., 1968). Im Labor ließ sich *FV-3* bislang bei Temperaturen von 12 bis 30 °C in insgesamt vier verschiedenen Fischzelllinien, 21 Reptilienzelllinien, primären Hühnerembryozellen und neun Säugetierzelllinien vermehren (Darlington et al., 1966; Gravell & Granoff, 1970; Essani & Granoff, 1989a; b).

Mehrere andere *Ranavirus*-Isolate, wie Frog virus 1, Frog virus 2, Lucké triturus virus 1, und Tadpole edema virus sind serologisch nah verwandt mit *FV-3* und werden heute aufgrund molekularbiologischer Merkmale (MCP-Gensequenz, Restriktionsfragment-Analysen) als Stämme von *FV-3* aufgefasst (Williams et al., 2000). Alle diese Virusstämme verursachen Ödeme bei Kaulquappen von Fröschen und Kröten mit meist letalem Krankheitsverlauf. Tadpole edema virus ist darüber hinaus auch für adulte Frösche und Kröten pathogen (Wolf et al., 1968).

Aus der Griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni*), der Vierzehenschildkröte (*Testudo horsfieldi*), der Carolina-Dosenschildkröte (*Terrapene carolina*) und anderen Reptilien, wurden in den letzten Jahren weitere Iridoviren, wie Tortoise virus 5, turtle virus 3 oder Testudo iridovirus, isoliert. Diese Viren verursachen unterschiedliche Krankheitsbilder mit vorwiegend respiratorischen Störungen, nekrotisch-ulzerierender Tracheitis, Lebernekrosen oder systemische Infektionen mit tödlichem Ausgang (Müller et al., 1988; Westhouse et al., 1996; Marschang et al., 1999). Auch diese Viren werden aufgrund

molekularbiologischer Daten als Stämme von *FV-3* angesehen (Williams et al., 2000; Essbauer & Ahne, 2001).

2.4.2.1.2 Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status

Bohle iridovirus (BIV)

BIV wurde 1992 aus australischen Sumpffröschen (*Limnodynastes ornatus*) isoliert, die eine hohe Sterblichkeit während der Metamorphose aufwiesen (Speare & Smith, 1992). Das Virus ist hochpathogen für Kaulquappen und juvenile Stadien verschiedener Amphibienspezies (*Limnodynastes ornatus*, *L. terrareginae*, *Bufo marinus*, *Litoria latopalmata*) und verursacht Nekrosen des haematopoetischen Gewebes und neurologische Symptome wie Apathie und motorische Dysfunktionen (Speare & Smith, 1992, Mutschmann 1998, S. 176). Es ist ebenfalls pathogen für Fische, wie Barramundis (*Lates calcarifer*) und Mosambik-Buntbarsche (*Oreochromis mossambicus*) (Moody & Owens, 1994; Cullen et al., 1995).

Epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV)

Unter der Bezeichnung „Epizootic haematopoietic necrosis virus“ werden eine Gruppe von Iridoviren zusammengefasst, die Nekrosen des haematopoetischen Gewebes bei Fischen verursachen. Nach dem 7. Taxonomiereport des ICTV (Williams et al., 2000) geht EHNV auf zwei australische Virusisolate zurück, auf das „Redfin perch virus (RFPV)“ aus dem Rotflossen-Flussbarsch (*Perca fluviatilis*), und auf das „Rainbow trout virus (RTV)“ aus der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) (Langdon et al., 1986; Langdon & Humphrey, 1987; Whittington & Reddacliff, 1995). Nah verwandte Virusisolate (Essbauer & Ahne, 2001) sind das „European sheatfish virus (ESV)“ aus dem europäischen Wels (*Silurus glanis*) in Deutschland (Ahne et al., 1997) und das „European catfish virus (ECV)“ aus dem schwarzen Katzenwels (*Ictalurus melas*) in Frankreich und Italien (Pozet et al., 1992). Alle diese Isolate sind für Fische hochpathogen und führen i.d.R. zu schweren systemischen Infektionen mit Nekrosen des haematopoetischen Gewebes. Die Mortalität bei EHNV ist wirtsabhängig. Sie ist hoch bei Flussbarschen und niedrig bei Regenbogenforellen. Bei einigen anderen Fischarten verläuft die Infektion klinisch inapparent (Mao et al., 1999).

Die Viren der EHN-Gruppe lassen sich bei 15 bis 28°C in einer Vielzahl von Fischzelllinien vermehren. Sie zeigen morphologische und serologische Übereinstimmungen mit *FV-3*,

lassen sich aber von der Typspezies der Gattung durch ihr Proteinprofil mit SDS-PAGE und durch Restriktionsfragment-Längen-Vergleiche (RFLP-Analyse) abgrenzen (Essbauer & Ahne, 2001).

Redwood park virus (RPV)

Das Redwood park virus (Syn.: Tadpole virus 2; Stickleback virus; Redwood creek virus RCV) wurde aus nordamerikanischen Stichlingen (*Gasterosteus aculeatus*) und unabhängig davon auch aus nordamerikanischen Fröschen (*Rana aurora*) isoliert (Mao et al., 1997).

Regina Ranavirus (RRV)

Das Regina Ranavirus wurde 1999 im Zusammenhang mit Massensterben bei kanadischen Querzahnmolchen (*Ambystoma tigrinum diaboli*) isoliert (Bollinger et al., 1999). RRV ist hoch kontagiös und verursacht systemische Infektionen mit Nekrosen des haematopoetischen Gewebes. Experimentell infizierte Larven und Adulttiere sterben innerhalb von 13 Tagen. Ein weiteres Virusisolat, das „*Ambystoma tigrinum virus (ATV)*“ aus „Tigersalamandern“ (*Ambystoma tigrinum stebbinsi*) in den USA (Jancovich et al., 1997) wird von dem ICTV als Stamm von RRV geführt. Mit ATV infizierte Querzahnmolche zeigen im Gegensatz zu mit RRV infizierten Tieren vor allem Hautveränderungen. Histologisch finden sich zytoplasmatische Einschlusskörper in Haut und Leber. ATV ist wie RRV für Querzahnmolche hoch kontagiös und führte wiederholt zu Massensterben bei natürlichen Populationen. Der nordamerikanische Tigersalamander (*Ambystoma tigrinum stebbinsi*) ist die größte Landsalamanderart der Welt und gilt in Nordamerika als vom Aussterben bedroht.

Santee-Cooper Ranavirus (SCRV)

Unter Santee-Cooper Ranavirus werden drei sehr ähnliche Iridoviren zusammengefasst, das „Largemouth bass iridovirus (LMBV)“ aus dem nordamerikanischen Forellenbarsch (*Micropterus salmoides*) (Plumb et al., 1996; 1999; Mao et al., 1999), das „Doctor fish virus (DFV-16)“ aus Putzerlippfischen (*Labroides dimidatus*) und das „Guppy virus 6 (GV-6)“ aus dem Zahnkärpfling Guppy (*Poecilia reticulata*) (Mao et al., 1997). DFV-16 und GV-6 wurden aus in die USA importierten südostasiatischen Fischen isoliert.

Für LMBV-Infektionen sind vor allem juvenile Forellenbarsche und Streifenbarsche (*Morone saxatilis*) empfänglich. Einziges Symptom der Erkrankung ist eine pathologisch vergrößerte

und entzündete Schwimmblase bei infizierten Individuen. Eine horizontale Virusübertragung wurde experimentell nachgewiesen. Darüber hinaus wird auch die Möglichkeit von vertikalen Virusübertragungen diskutiert, da hohe Viruskonzentrationen in den Gonaden geschlechtsreifer Fische nachgewiesen wurden (Plumb et al., 1996). Mit DFV-16 und GV-6 ließen sich experimentell auch Regenbogenforellen und Königslachse (*Oncorhynchus tshawytscha*) infizieren. Die Pathogenität der beiden Viren war bei diesen Wirten jedoch gering (Hedrick & McDowell, 1995).

2.4.2.2 Die Gattung *Lymphocystivirus*

2.4.2.2.1 *Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1)*

Die Lymphocystis disease (LCD) ist eine seit beinahe 100 Jahren bekannte Erkrankung der Schollen (*Pleuronectes platessa*) und Flundern (*Platichthys flesus*), die mit Hautveränderungen in Form von benignen Tumoren aus hypertrophierten Bindegewebszellen einhergeht. Das verursachende, infektiöse Agens *Lymphocystis disease virus 1* (Syn.: Flounder lymphocystis disease virus; Flounder virus) kommt in mehreren, morphologisch (aufgrund sehr variabler Partikelgrößen von 200 bis 380 nm) unterscheidbaren Stämmen vor (Essbauer & Ahne, 2001). Die Virusfreisetzung erfolgt durch die Degeneration und den Zerfall von Hautläsionen erkrankter Tiere. Die Übertragung auf gesunde Tiere erfolgt durch direkten Kontakt. Haupteintrittspforte für die Infektion sind die Kiemen der Fische. Eine hohe Wirtsdichte, das Vorhandensein von Ektoparasiten, und äußere Hautverletzungen fördern die Übertragung (Williams et al., 2000). Die ökonomische Bedeutung der Erkrankung ist bei Freilandfängen relativ gering, da sie in betroffenen Tieren meist von selbst ausheilt. In Fischzuchtbetrieben können allerdings ökonomisch bedeutende Ausfälle auftreten.

LCDV-1 kann im Labor nur mit Schwierigkeiten kultiviert werden. So scheitern beispielsweise Untersuchungen zum Replikationszyklus von *LCDV-1* bislang an der Verfügbarkeit eines geeigneten Zellkultursystems (Williams et al., 2000). Das Genom wurde dagegen vollständig sequenziert und enthält 195 potentielle ORFs (Tidona & Darai, 1997). Die Abgrenzung der Gattung *Lymphocystivirus* von der Gattung *Ranavirus* erfolgt aufgrund der geringen DNA-Homologie zwischen *FV-3* und *LCDV-1*.

2.4.2.2.2 Virusisolate mit unsicherem taxonomischen Status**Lymphocystis disease virus 2 (LCDV-2)**

LCDV-2 ist der Erreger der Lymphocystis disease der Klieschen (*Limanda limanda*). Die Erkrankung verläuft analog zur LCD bei Schollen und Flundern. Die Abgrenzung von *LCDV-1* erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wirtsspezifität, und aufgrund histopathologischer und molekularbiologischer Merkmale wie Proteinprofilen, und dem Vergleich bekannter DNA Sequenzen mittels PCR-Techniken (Chinchar et al., in Vorb.). Die bisher zur Verfügung stehenden Daten über LCDV-2 reichen nicht aus um das Virus als eigene Spezies innerhalb der Gattung *Lymphocystivirus* zu führen.

3. Eigene Untersuchungen

3.1 Ergebnisse – Teil I

F. T. Just, S. S. Essbauer

„Characterization of an Iridescent Virus isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae)“

Journal of Invertebrate Pathology **77**: 51-61 (2001)

Journal of Invertebrate Pathology 77, 51–61 (2001)
doi:10.1006/jipa.2000.4985, available online at <http://www.idealibrary.com> on IDEAL®

Characterization of an Iridescent Virus Isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae)

Frank T. Just and Sandra S. Essbauer

Institut für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität München, Kaulbachstrasse 37, D-80539 München, Germany

E-mail: just@stud.vetmed.uni-muenchen.de

Received May 11, 2000; accepted October 17, 2000; published online January 2, 2001

We have isolated an iridescent virus from commercially produced colonies of *Gryllus bimaculatus* in Germany, which showed apparent mortality. Transmission electron microscopy studies on adult cricket specimens revealed the paracrystalline assembly of icosahedral virus particles in the cytoplasm of hypertrophied abdominal fat body cells. The infecting agent could be cultivated in the lepidopteran cell line sf-9, where it caused cytopathogenic effects such as cell hypertrophy, cytoplasmic vacuolization, and cell death within 8 days postinfection. Infection titers of the first virus passage reached $10^{7.5}$ TCID₅₀/ml. Negatively stained virus particles ($n = 100$) had dimensions of 172 ± 6 nm (apex to apex) and 148 ± 5 nm (side to side). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of virus proteins showed more than 20 distinct polypeptides with a major species of approximately 50 kDa. Analysis of the restriction fragment length profiles from digestion of purified viral DNA with the endonucleases *EcoRI*, *BamHI*, and *HindIII* showed marked differences from the profiles of iridoviruses of lower vertebrates (genus *Ranavirus*), e.g., *Rana esculenta* Iridovirus and *Frog virus 3*. Restriction enzyme digests with the endonucleases *MspI* and *HpaII* indicated the lack of methylation of viral DNA. Polymerase chain reaction led to the amplification of a 420-bp gene fragment with 97% sequence homology to the major capsid protein gene of *Chilo iridescent virus*. These data indicate that this new isolate, which we propose to be termed *Gryllus bimaculatus* iridescent virus, belongs to the genus *Iridovirus* of the family *Iridoviridae*. © 2001

Academic Press

Key Words: *Iridoviridae*; insect virus; *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV); *Chilo iridescent virus* (CIV); virus characterization; major capsid protein (MCP); *Gryllus bimaculatus*.

INTRODUCTION

The family *Iridoviridae*, which is divided into the four genera *Ranavirus*, *Lymphocystivirus*, *Iridovirus*,

and *Chloriridovirus*, comprises large (120- to 300-nm) icosahedral viruses of lower vertebrates and invertebrates. The members of the genus *Ranavirus* have been reported to cause systemic infections in fishes, amphibians, and reptiles, whereas *Lymphocystivirus* species cause benign chronic epidermal infections in fishes (Ahne *et al.*, 1997; Mao *et al.*, 1997). The genome of these vertebrate iridoviruses consists of one molecule of linear double-stranded DNA (Williams *et al.*, 2000), which is characterized by the methylation of some 20% of its cytosine residues; this apparently protects the viral DNA from degradation by vertebrate endonucleases (Goorha *et al.*, 1984). In contrast, the genera *Iridovirus* and *Chloriridovirus* represent iridescent viruses that lack DNA methylation and that cause fatal diseases in a number of invertebrates, especially insects. To date, more than 30 iridescent virus isolates have been reported from isopods (Federici, 1980; Cole and Morris, 1980), lepidopterans (Fukaya and Nasu, 1966; Carey *et al.*, 1978), hymenopterans (Bailey *et al.*, 1976), dipterans (Xeros, 1954), coleopterans (Steinhouse and Leutenegger, 1963; Kalmakoff *et al.*, 1972; Carey *et al.*, 1978; Black *et al.*, 1981; Lacey and Adams, 1994), and orthopterans (Kleespies *et al.*, 1999). The assembly of invertebrate iridovirus particles takes place in the cytoplasm of the host cell where they form extensive paracrystalline arrays resulting in a characteristic blue-green opalescence of the infected tissue (Ward and Kalmakoff, 1991). This phenomenon has been the major tool for the diagnosis of iridovirus infections of invertebrates in the past. However, not all iridovirus isolates exhibit this characteristic, and therefore, the value of this characteristic to virus determination is limited (Kelly, 1985).

The members of the genus *Iridovirus* are commonly able to infect a wide variety of insect hosts (Williams and Cory, 1994; Webby and Kalmakoff, 1998). Therefore, the formerly used classification system based mostly on the host species has often resulted in the description of identical isolates as different virus spe-



cies and has led to the introduction of numerous species-name synonyms into the genus *Iridovirus*.

Recent investigations have shown that one useful approach to a new classification system of iridoviruses is the comparison of the gene sequence of the major capsid protein (MCP) by polymerase chain reaction (PCR) techniques (for a review, see Tidona *et al.*, 1998). Here, we report some characteristics of a putative new iridovirus isolated from crickets (*Gryllus bimaculatus*) commercially produced in Germany. On the basis of a 420-bp sequence of the MCP gene, we present the phylogenetic relationship of this iridovirus isolate to previously characterized iridoviruses.

MATERIALS AND METHODS

Insects

A colony of a commercially produced stock of *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera, Gryllidae) was obtained from a local petshop in Bavaria, Germany, which in turn had bought the insects from a Bavarian breeder. For laboratory use, groups of 20 adult individuals were reared at 20°C in 70–80% relative humidity, with natural light, and with unrestricted access to food and water. Under these conditions, all individuals died within 14 days, showing clinically apparent behavior such as apathy, ataxia, and disorientation. One half of the dead individuals of both sexes was screened for the presence of virus particles by transmission electron microscopy. The remaining half was frozen at –20°C and subsequently used for virus isolation and characterization.

Transmission Electron Microscopy

The heads, flight muscles, testes, ovaries, salivary glands, Malpighian tubules, samples from various locations in the gut, and abdominal fat bodies from adults of both sexes were dissected in a fixative containing 5% glutaraldehyde, 4% formaldehyde, buffered with 0.1 M Na-phosphate, pH 7.4. The isolated tissues were prefixed in the same solution for 2 h at 4°C, washed with 0.1 M Na-phosphate buffer, and postfixed in 1% OsO₄ in 0.1 M Na-phosphate buffer. All specimens were stained for 90 min in 2% aqueous uranyl acetate, dehydrated in graded ethanol, and embedded in ERL 4206. The blocks were sectioned on an Ultracut microtome (Reichert-Jung, Nussloch, Germany). Sections were stained with KMnO₄ and lead citrate and examined with a transmission electron microscope EM 109 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 80 kV.

Virus Isolation and Propagation

The fat body of frozen individuals was suspended in 300 µl protein-free insect cell culture medium "Ba-

culoGold" (Pharmingen, San Diego, CA), containing 50 µg/ml gentamycin. The suspension was homogenized with a glass pipette, followed by ultrasonic treatment for 3 × 30 s, with periods of 1 min on ice. After incubation of the mixture for 2 h at 4°C in 500 µg/ml gentamycin, the preparation was clarified for 10 min at 20,800g at 4°C. The lepidopteran cell line sf-9, derived from *Spodoptera frugiperda* ovarian cells (Invitrogen, Groningen, The Netherlands), was propagated at 28°C in "TNM-FH Insect Medium" (Pharmingen), supplemented with 50 µg/ml gentamycin. Confluent cell cultures (75 cm²) were inoculated either with 100 µl homogenized cricket tissue or 100 µl cell culture medium as a control. After 1 h adsorption, 20 ml medium was added, and the cultures were incubated at 28°C for 7 to 10 days. Cytopathogenic effects were observed by phase contrast microscopy (Olympus IMT-2 inverse light microscope).

Passaging of the virus was carried out by repeated freezing and thawing of infected sf-9 cell cultures 8 days p.i., followed by ultrasonic treatment and centrifugation for 30 min at 5000g at 4°C. Titration of the virus was carried out using adherent sf-9 monolayers in 24-well cell culture plates and 10-fold dilutions of virus ranging from 10⁻¹ to 10⁻¹¹.

Subsequently, the infected sf-9 cultures and the corresponding controls were examined for the presence of virus particles by electron microscopy.

Purification of Virus

For virus purification, the infectious cell-free supernatant of sf-9 cell cultures was layered over 35% sucrose and centrifuged for 90 min at 35,000g at 4°C in a Beckmann L5-50B ultracentrifuge (SW 28 rotor). The resulting virus pellet, showing the characteristic blue opalescence of insect iridoviruses, was resuspended in 400 µl distilled water at 4°C and centrifuged for 5 min at 3800g at 4°C; the supernatant was stored at –20°C.

Negative Staining

A 5-µl aliquot of the purified virus solution was stained for 5 s with the same volume of 2% phosphotungstic acid on pioloform-coated copper grids. The dried grids were examined with a transmission electron microscope EM 109 (Carl Zeiss) at 80 kV.

Viral Protein Gel Electrophoresis

Aliquots of the purified virus were diluted in Laemmli's dissociation buffer. The samples were denatured for 5 min at 95°C and loaded onto a 10% SDS polyacrylamide gel. The proteins were separated at 35 mA constant current and revealed by Coomassie blue staining.

Extraction of Viral DNA

Aliquots of 100 μ l purified virus solution were digested overnight in 1% SDS, 100 μ g/ml proteinase K (ROTH, Karlsruhe, Germany) 40 μ g/ml ribonuclease A (ROTH) at 37°C. The DNA was extracted by successive treatment with phenol, phenol/chloroform, and chloroform/isoamyl alcohol (24:1). After ethanol precipitation, the DNA pellet was resuspended in 30 μ l distilled water.

Restriction Enzyme Digests

Restriction endonucleases *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *MspI*, and *HpaII* were obtained from AGS (Heidelberg, Germany). The digestion reaction was carried out overnight at 37°C, corresponding to the manufacturer's protocols. Restriction fragments were separated on 0.7% agarose gels at 20-V constant voltage in 0.5 \times TAE buffer and stained with 1 μ g/ml ethidium bromide.

Polymerase Chain Reaction and Sequencing of PCR Products

For the amplification of a 500-bp region of the major capsid protein gene of the isolate, we used the primers PCRFOR (5'ACCATTACATTTAATGATTTGG) and PCRREV (5'TTTTGACGTGGTGCAGTTTGAAC), corresponding to *Chilo iridescent virus* MCP gene positions 349–370 and 835–857, respectively (Webby and Kalmakoff, 1998). The primers were synthesized by MWG Biotech (Ebersberg, Germany).

An aliquot of 1 μ l purified virus solution was added to 99 μ l PCR solution, containing 10 mM Tris/HCl, 50 mM KCl, pH 8.3, 0.75 mM MgCl₂, 0.3 mM dNTP, 2 pmol/ μ l of each primer solution, and 0.025 U/ μ l *Taq* polymerase (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany). The amplification was carried out in a "Mini-cycler" (MJ Research, Watertown, MA) according to the protocol given by Webby and Kalmakoff (1998). Thus, 1 cycle of 94°C for 2 min, 45°C for 2 min, and 72°C for 5 min was followed by 28 cycles of 94°C for 30 s, 45°C for 30 s, 72°C for 1 min and by one terminal cycle of 94°C for 1 min, 45°C for 1 min, and 72°C for 5 min.

PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany), corresponding to the manufacturer's instructions. The quality of the products was determined on 1.5% agarose gels, and the products were sequenced by the GATC Sequencing Service (Konstanz, Germany), resulting in a 420-bp nucleotide sequence.

Computer Analysis

The 420-bp PCR product sequence, together with the reported MCP partial gene sequences of 14 other iridescent viruses and the corresponding sequence of

Lymphocystis disease virus 1 (LCDV-1), were aligned by the program CLUSTAL W (EMBL; Heidelberg, Germany), which is available on the Internet. Table 1 summarizes information about the hosts, GenBank accession numbers, and references for the selected viruses. Phylogenetic analyses were performed by SEQBOOT, DNAPARS, and CONSENSE (Phylogeny Inference Package, Version 3.5c, 1995; Felsenstein J., Seattle, WA). A phylogenetic tree was generated by maximum-parsimony (bootstrap 100 times) with the LCDV-1 MCP-gene (GenBank Accession No. L 63545) as an outgroup.

RESULTS

Cytopathology in Cell Cultures

Adherent cultures of the lepidopteran cell line sf-9 inoculated with the supernatant of cricket fat body homogenate showed progressing cytopathogenic effects within 8 days of incubation at 28°C. The reduced cell density of infected cultures in comparison with the controls is illustrated in Fig. 1. After infection, an initial cell hypertrophy with an approximately threefold increase in cell diameter was followed by detachment of the cells from the culture flask surface, vacuolization of single cells, and cell lysis (Fig. 1b). The electron microscopical investigation of these cultures (see below) revealed that the observed cytopathogenic effects were attributable to virus replication. Titration of the virus from sf-9 cultures resulted in virus titers of 10^{7.5} TCID₅₀/ml.

Electron Microscopy

The ultrastructural investigation of selected cricket organs revealed that the GbIV particles were restricted to fatty tissues. Whereas testes, ovaries, salivary glands, and Malpighian tubules were free of virus particles, a few particles were observed in the flight muscles and the fat body surrounding the hypopharynx of the animals (data not shown). Numerous intracellular virus particles were seen in the abdominal fat body. Figure 2 illustrates the morphology of the GbIV in both *Gryllus* abdominal fat body cells and lepidopteran sf-9 cell cultures. Virus particles were abundant in the cytoplasm, forming paracrystalline structures (Figs. 2a and 2b). Ultrathin-sectioned intracellular virus particles and negatively stained isolated material expressed a sixfold symmetry indicating an icosahedral geometry (Figs. 2c and 2d). The mean size of negatively stained virus particles ($n = 100$) was 172 \pm 6 nm (apex to apex) and 148 \pm 5 nm (side to side) in comparison with 159 \pm 4 nm (apex to apex) and 139 \pm 5 nm (side to side) in thin-sectioned material. Transverse sections through single particles illustrated that the virus consisted of an electron-dense core surrounded by a two-part shell

TABLE 1
List of Invertebrate Iridescent Virus Species Names, Abbreviations, and References Used for the Phylogenetic Tree in This Study

Virus name abbreviation, synonyms, and full name		Host of isolation	Accession No.	References (origin, MCP sequence)
GbIV	<i>Gryllus bimaculatus</i> iridescent virus	<i>Gryllus bimaculatus</i>	AF 247641	This study
IIV1 (TIV)	<i>Invertebrate iridescent virus 1</i> (<i>Tipula</i> iridescent virus)	<i>Tipula paludosa</i>	M 33542	Xeros, 1954 Tajbakhsh <i>et al.</i> , 1990
IIV2 (SIV)	<i>Invertebrate iridescent virus 2</i> (<i>Sericesthis</i> iridescent virus)	<i>Sericesthis pruinosa</i>	AF 042335	Steinhouse and Leutenegger, 1963 Webby and Kalmakoff, 1998
IIV6 (CIV)	<i>Invertebrate iridescent virus 6</i> (<i>Chilo</i> iridescent virus)	<i>Chilo suppressalis</i>	M 99395	Fukaya and Nasu, 1966 Strohwasser <i>et al.</i> , 1993
IIV9 (WIV)	<i>Invertebrate iridescent virus 9</i> (<i>Wiseana</i> iridescent virus)	<i>Wiseana cervinata</i>	AF 025774	Kalmakoff and Robertson, 1970 Webby and Kalmakoff, 1999
IIV16 (CzIV)	<i>Invertebrate iridescent virus 16</i> (<i>Costelytra zealandica</i> iridescent virus)	<i>Costelytra zealandica</i>	AF 025775	Kalmakoff <i>et al.</i> , 1972 Webby and Kalmakoff, 1999
IIV22	<i>Invertebrate iridescent virus 22</i> (<i>Simulium</i> sp. iridescent virus)	<i>Simulium</i> sp.	AF 042341 (M 32799)	Cameron, 1990 Webby and Kalmakoff, 1998
IIV23 (BbIV)	<i>Invertebrate iridescent virus 23</i> <i>Heteronychus arator</i> iridescent virus	<i>Heteronychus arator</i>	AF 042342	Carey <i>et al.</i> , 1978 Webby and Kalmakoff, 1998
IIV24	<i>Invertebrate iridescent virus 24</i> <i>Apis</i> iridescent virus	<i>Apis cerana</i>	AF 042340	Bailey <i>et al.</i> , 1976 Webby and Kalmakoff, 1998
IIV29	<i>Invertebrate iridescent virus 29</i> <i>Tenebrio molitor</i> iridescent virus	<i>Tenebrio molitor</i>	AF 042339	Black <i>et al.</i> , 1981 Webby and Kalmakoff, 1998
IIV30	<i>Invertebrate iridescent virus 30</i> <i>Helicoverpa zea</i> iridescent virus	<i>Helicoverpa zea</i>	AF 042336	Stadelbacher <i>et al.</i> , 1978 Webby and Kalmakoff, 1998
IIV31	<i>Invertebrate iridescent virus 31</i> <i>Armadillidium vulgare</i> iridescent virus	<i>Armadillidium vulgare</i>	AF 042337	Cole and Morris, 1980 Webby and Kalmakoff, 1998
PjIV	<i>Popillia japonica</i> iridescent virus	<i>Popillia japonica</i>	AF 042338	Lacey and Adams, 1994 Webby and Kalmakoff, 1998
AgIV	<i>Anticarsia gemmatalis</i> iridescent virus	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	AF 042343	Williams, 1994 Webby and Kalmakoff, 1998
LCDV-1	<i>Lymphocystis disease virus</i> (vertebrate virus)	<i>Platichthys flesus</i>	L 63545	Tidon and Darai, 1997

Note. Official virus species names are in italics, whereas tentative virus species names are not italicized (cf. Williams *et al.*, 2000).

(Fig. 1e). The inner part of the shell had a trilamellar appearance with one electron-lucent sheet in the middle surrounded by two electron-dense sheets. Therefore, it resembled a lipid bilayer of approximately 4–5 nm thickness (Fig. 2e, arrowhead). Amorphous electron-dense material formed the 10- to 12-nm-thick outer part of the virus shell.

SDS-PAGE of Viral Polypeptides

The separation of GbIV proteins on a 10% SDS polyacrylamide gel is illustrated in Fig. 3. The protein profile consists of more than 20 protein bands with one major species of approximately 50 kDa, which represents the major capsid protein of the virus (Fig. 3, lanes 1 and 2).

Restriction Endonuclease Digests

Total GbIV DNA was isolated from the first virus passage in sf-9 cell cultures and digested with the restriction endonucleases *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *MspI*, and *HpaII*. The restriction fragment length profiles are given in Fig. 4. Although numerous cleavage sites could be observed with *EcoRI*, *HindIII*, *MspI*, and *HpaII* (Fig. 4, lanes 3 and 5–7), only eight distinct

fragments could be produced with the endonuclease *BamHI* (Fig. 4, lane 4). The digestion of GbIV DNA with the endonucleases *MspI* and *HpaII* resulted in identical profiles, indicating that the isolated DNA was not methylated (Fig. 4, lanes 5–6).

Polymerase Chain Reaction

The two primers PCRFOR and PCRREV amplified a single DNA fragment of approximately 500 bp. Control experiments without viral DNA in the reaction solution failed to produce an amplicon. The amplified DNA fragment was sequenced and compared with the corresponding MCP gene sequences of 14 selected members of the family *Iridoviridae*. Table 1 summarizes the names, synonyms, MCP GenBank accession numbers, and references of the viruses used for this comparison. In the case of *Invertebrate iridescent virus type 22* (IIV22), two slightly different MCP gene sequences have been published, and therefore, both of them have been taken into account. The alignment of the GbIV PCR product with the corresponding sequences of these 15 iridovirus isolates is given in Fig. 5. The nucleotide sequence homologies between the GbIV sequence and the MCP gene sequences of the other vi-

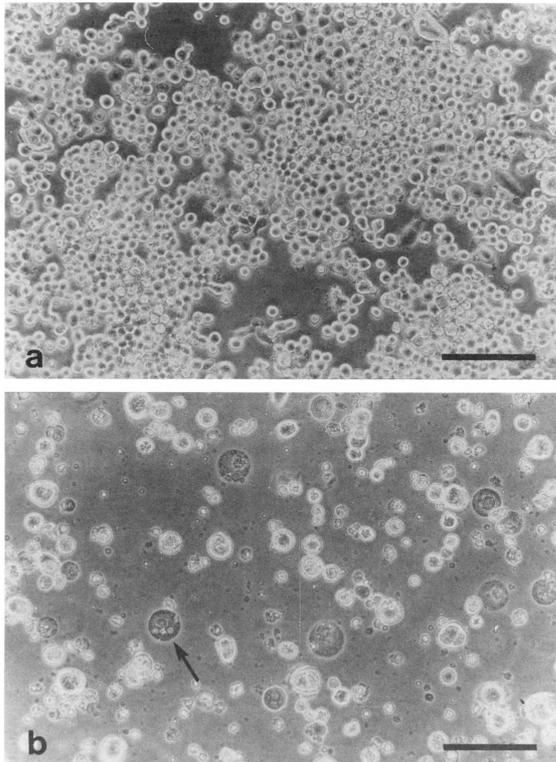


FIG. 1. Cytopathogenic effects of *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV) infection in lepidopteran sf-9 cell cultures. (a) Phase-contrast micrograph of the noninfected control; bar, 250 μm . (b) GbIV-infected culture 8 days p.i. Note the decreased cell density, the cell hypertrophy, and the vacuolization of single cells (arrow); bar, 250 μm .

ruses ranged from 59.8% (LCDV-1) to 97.8% (CIV), indicating that the isolated PCR product of GbIV is indeed a fragment of the MCP gene. One hundred and eleven bases or 26.4% were identical in all of the compared gene fragments (Fig. 5, asterisks), indicating the degree of gene conservation within this group of iridescent viruses. Nine nucleotide differences were detected between the GbIV sequence and the CIV. As illustrated in Fig. 6, these differences result in two changes within the deduced amino acid sequences of the partial MCP of both viruses. The amino acid positions isoleucine-18 and leucine-30 of the partial MCP of GbIV corresponded to valine-18 and alanine-30 in the CIV sequence (Fig. 6).

Phylogenetic Analyses

Figure 7 summarizes the proposed phylogenetic relationships between GbIV and the selected iridoviruses calculated from their partial MCP gene sequences by

maximal-parsimony analyses. Three groups of viruses can be distinguished: group I consists of GbIV and CIV, group II contains IIV31 and PjIV, and group III comprises the 11 remaining iridoviruses (Fig. 7).

DISCUSSION

In this study, we described the isolation and characterization of a potentially novel iridescent virus from *G. bimaculatus*. Our data from electron microscopy reveal that GbIV exhibits the major morphological characteristics of an iridovirus. A sixfold symmetry of virus particles can be observed in ultrathin sections of cricket tissues, in infected lepidopteran sf-9 cells, and in negatively stained material. With sizes of 172 nm (apex to apex) and 148 nm (side to side), the particles exhibit dimensions ranging between the reported typical sizes of small (genus *Iridovirus*: 120–140 nm) and large (genus *Chloriridovirus*: 180–200 nm) invertebrate iridoviruses (Williams, 1996).

The ultrastructural investigations of GbIV particles show an electron-dense core surrounded by an internal lipid bilayer and an outer electron-dense shell. This is in accordance with structural data of other members of the family *Iridoviridae* (Stoltz, 1971; Kelly and Vance, 1973; Heppell and Berthiaume, 1992; Kelly, 1985). The nucleoprotein core of iridoviruses is surrounded by an internal lipid membrane (characteristically 4 nm in thickness) and a protein shell forming the icosahedral particle. The lipid composition of the internal lipid bilayer has been shown to be different from that of host cell membranes (Kelly and Vance, 1973; Williams and Thompson, 1995). Various investigators have proposed that the lipid bilayer of the virus shell may be related to the ecological properties of iridoviruses, which commonly show an affinity to poikilothermic animals having an aquatic or soil stage in their life cycle (Federici, 1980; Kelly, 1985; Heppell and Berthiaume, 1992). However, further studies have to be carried out to establish this hypothesis.

The distribution pattern of GbIV particles in infected cricket specimens has revealed that viral replication is located primarily in the fatty tissues of the head and the abdomen. Single virus particles have also been detected between the fibers of the flight muscles, but paracrystalline structures or virogenic stroma (Ward and Kalmakoff, 1991) are found only in fat body cells. Therefore, the distribution pattern of GbIV seems to correspond to the pattern of other insect iridescent viruses, such as *Chilo iridescent virus* (Devauchelle *et al.*, 1985). Interestingly, neither virus, viz. CIV and GbIV, has been observed in the ovarian cells of the insect host, indicating that a transovarial transmission of these viral infections is unlikely. Vertical transmission, however, has been reported in *Invertebrate iridescent virus 3* (IIV-3), a member of the genus *Chloriridovirus* (Linkey and Nielsen, 1968).

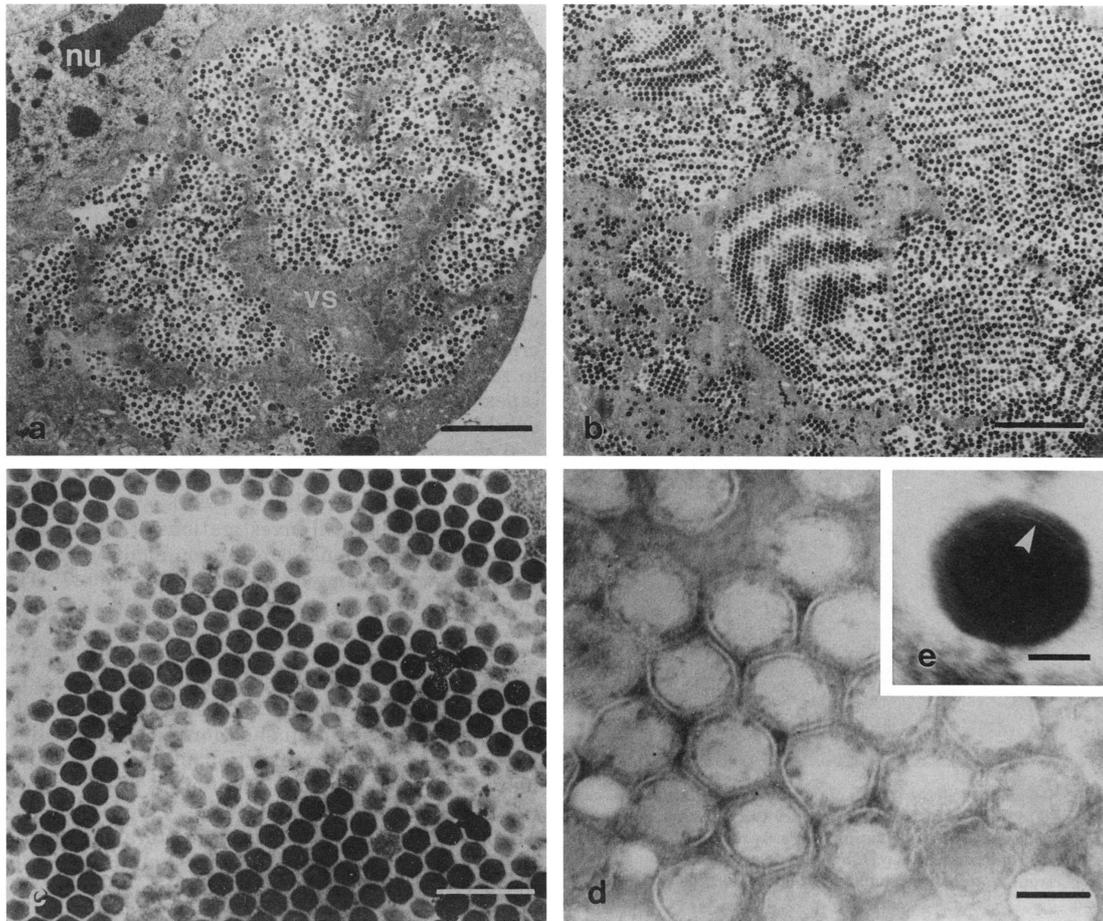


FIG. 2. (a) Electron micrograph of a GbIV-infected sf-9 cell. The assembly of virus particles takes place in the virogenic stroma (vs) within the cytoplasm. The nucleus (nu) is free of particles; bar, 3 μm . (b) Ultrathin section through a virus-infected *Gryllus bimaculatus* fat body cell. A paracrystalline arrangement of virus particles is found in the cytoplasm; bar, 3 μm . (c) Detail of a paracrystalline structure at higher magnification illustrating the sixfold symmetry of the virus particles in ultrathin sections; bar, 700 nm. (d) Negatively stained virus particles purified by ultracentrifugation; bar, 100 nm. (e) Ultrathin section through one intracellular virus particle at higher magnification. The electron-dense outer shell of the virus is succeeded by another shell that resembles a lipid bilayer (arrowhead); bar, 50 nm.

The cytopathogenic effects of GbIV infections observed in both cricket fat body cells and lepidopteran sf-9 cell cultures are similar to those reported in other iridovirus infections (Federici, 1980; Ward and Kalmakoff, 1991; Kleespies *et al.*, 1999). Cell hypertrophy, the rounding and detachment in cell cultures, vacuolization, syncytia formation and nuclear hypertrophy preceding cell death, and the release of newly synthesized virus particles are commonly observed. Cell budding and cell lysis or virus extrusion in vacuoles are reported routes for the release of iridoviruses from infected host cells, depending on the investigated species (Ward and Kalmakoff, 1991). We have never ob-

served budding of GbIV in cricket tissues or in infected sf-9 cells. Although we cannot finally determine from our ultrastructural data the route by which the viruses are released, the large amounts of virus particles in infected cells suggest that total cell lysis takes place.

One-dimensional SDS-PAGE of GbIV proteins has resolved more than 20 polypeptides with one major species of approximately 50 kDa (Fig. 3). These data have the characteristics of those of iridoviruses (Moore and Kelly, 1980; Kelly, 1985; Ward and Kalmakoff, 1991; Williams, 1996; Mao *et al.*, 1997; Webby and Kalmakoff, 1999). Surface labeling experiments on various iridovirus species have revealed that the 50-

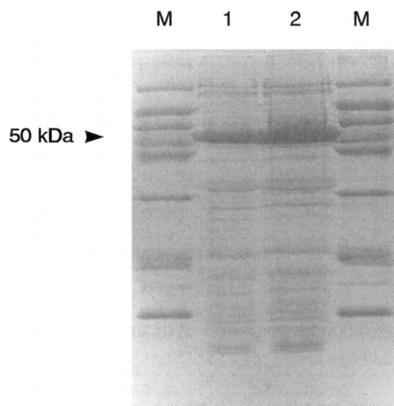


FIG. 3. SDS-PAGE of GbIV proteins (lanes 1 and 2). The protein profile shows more than 20 polypeptide bands with a major species of approximately 50 kDa, which represents the major capsid protein of the virus. M, Mid-range protein molecular weight marker (Promega, Mannheim, Germany) containing phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), glutamate dehydrogenase (55 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), aldolase (40 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), and lysozyme (14.4 kDa).

kDa protein band, which comprises 40–45% of the total viral protein, corresponds to the MCP (Moore and Kelly, 1980). The virus capsomeres have been proposed to consist of oligomers of this single polypeptide (Cerutti and Devauchelle, 1990), which exhibits a hydrophilic exterior and a hydrophobic interior to interact with the environment and the internal lipid membrane, respectively (Moore and Kelly, 1980). Little information is available concerning the possible function of iridovirus proteins other than the MCP. Recent DNA sequencing has shown that CIV exhibits sequence homologies to genes encoding for a number of enzymes, such as DNA-dependent RNA polymerase, helicase, thymidylate synthase, protein-tyrosine phosphatase, two possible apoptosis inhibitor homologs, and others (Bahr *et al.*, 1997).

Restriction enzyme analysis of isolated GbIV DNA with the endonucleases *EcoRI*, *BamHI*, *HindIII*, *MspI*, and *HpaII* has revealed that the restriction fragment patterns of GbIV differ from those obtained from experiments with iridoviruses of lower vertebrates, such as *Rana esculenta* iridovirus (REIR) or *Frog virus 3* (FV-3). The genomes of these viruses do not show cleavage sites for *EcoRI*, but they exhibit numerous cleavage sites for *BamHI* (Ahne *et al.*, 1998). In contrast to invertebrate iridoviruses, the genome of vertebrate iridoviruses has been shown to be methylated by a virus-specific methyltransferase (Mao *et al.*, 1997). The methylation of viral DNA at cytosine residues is a characteristic stage of the replication cycle of these viruses, protecting newly synthesized virus DNA from digestion by vertebrate cytoplasmic endonucleases

(Goorha *et al.*, 1984). Methylated viral DNA can be distinguished from unmethylated forms by digestion with the endonucleases *MspI* and *HpaII*. These restriction enzymes have the same cleavage site (CCGG). However, whereas *MspI* is able to cleave viral DNA in the presence of methylcytosine, *HpaII* is not. GbIV DNA is degraded by both endonucleases. Thus, it must be unmethylated and exhibits the expected characteristics of invertebrate iridovirus DNA.

In addition to restriction endonuclease analysis, DNA–DNA hybridization, and serological techniques, PCR of the MCP gene has recently been used to investigate the phylogenetic relationships within the family *Iridoviridae* (Williams, 1996; Webby and Kalmakoff, 1998). It is now generally accepted that the family can be divided into four genera, viz. *Ranavirus*, *Lymphocystivirus*, *Chloriridovirus*, and *Iridovirus* (Williams *et al.*, 2000). Within the last-mentioned genus, three complexes of invertebrate viruses have been distinguished (Williams, 1994; Williams and Cory, 1994; Webby and Kalmakoff, 1998). To investigate the position of GbIV within this system, we have sequenced and aligned the PCR-produced 420-bp DNA fragment from isolated viral DNA with 15 selected iridovirus isolates (Fig. 5). This fragment exhibits 97.8% sequence homology to the MCP of *Chilo iridescent virus* (CIV), corresponding to nine nucleotide differences. The alignment of the deduced amino acid sequences has revealed that two positions are different between the partial MCP of GbIV and CIV (Fig. 6). However, both viruses exhibit

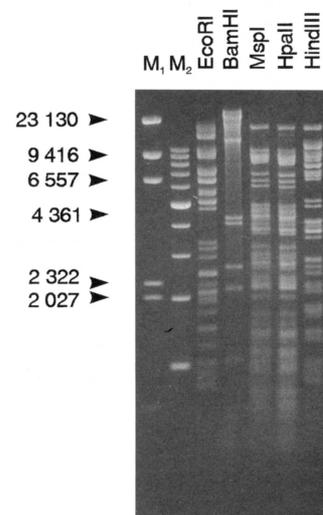


FIG. 4. Restriction fragment profiles of GbIV DNA, digested with *EcoRI*, *BamHI*, *MspI*, *HpaII*, and *HindIII*. The sizes of the restriction fragments are given in base pairs. Note that the profiles of *MspI*- and *HpaII*-digested DNA are identical. M1, λ DNA *HindIII* size standard; M2, 1-kb DNA ladder (Promega, Mannheim, Germany).

GbIV (AF 247641)	TTTACAACACCTGC-GTCAAAGGCAAGTTGGTTACGATAATATGATTGGAAATATTTCTGC	59
CIV (M 99395)-.....G.....	59
IIV31 (AF 042337)	..C.C.C.....-A.C.....G.A.A.T.C.C.....T.C.....G..	59
PjIV (AF 042338)	..C.C.C.....-A.C.....G.A.A.T.C.C.....T.C.....G..	59
IIV29 (AF 042339)TGTTG.C.A.TAGT...C.A.A.-.A.T.....G.....A..	59
AgIV (AF 042343)TGTTG.C.A.TAGT...C.A.A.-.A.T.....G.....A..	59
IIV30 (AF 042336)TGTTG.C.A.TAGT...C.A.A.-.A.T.....G.....A..	59
IIV24 (AF 042340)	..C.GGTT.G.TAGT...C.T...-A.T.C.....A...T..	59
BbIV (AF 042342)	..C.CGT...A.GAG...C.A.-.A.T.C.C.....C.C..AA.	59
SIV (AF 042335)	..C.CGT...A.CAGT...C.T.C.-.G.T.....G.A.....	59
WIV (AF 025774)	..C.CGT...G.TAGT...C.T.CC-.G.T.....G.C...T..	59
CzIV (AF 025775)	..C.CGT...A.AAGT...AAA.T-.A.....C.C.....	59
IIV22 (AF 042341)	..C.CGT.....CAG...C.A.-.G.T.....T..G.C...T..	59
IIV22 (M 32799)	..C.CGT.....CAG...C.A.-.G.T.....T..G.C...T..	59
TIV (M 33542)	..C.CGT.....CAG...C.A.-.G.T.....T..G.C...T..	59
LCDV-1 (L 63545)	..C.GT.TGTTG..GCTCT...A.-.CA.....TA.....CAAT..A	59
	*** *	
GbIV (AF 247641)	TCTTATTCAACCACAACCTGTACTTCTCTCTGCAACAGTAAGTCTTCCTGAAGCTGA	119
CIV (M 99395)GC.....	119
IIV31 (AF 042337)C.....T.G...CC..A..GCA.....G.....GTC.....AT..	119
PjIV (AF 042338)C.....T.G...CC..A..GCA.....G.....GTC.....GAT..	119
IIV29 (AF 042339)	AT.A.-T..T.-.TGTTGC.C.TG..G..G.TCTTGGTCCA----C.GG..G.A.AA.	113
AgIV (AF 042343)	AT.A.-T..T.-.CGTTGC.C.TG..G..G.TCTTGGTCCA----C.GG..G.A.AA.	113
IIV30 (AF 042336)	AT.A.-T..T.-.CGTTGC.C.TG..G..G.TCTTGGTCCA----C.GG..G.A.AA.	113
IIV24 (AF 042340)	.T.A.-A.....-GTTGC.C.TG..G..TCTTGGACCCAC----CAGG..G.A.A.	113
BbIV (AF 042342)	.T.G.-T.....-GTTGCC.AG..GGAAGT.TGGGAG..C----CCGG..G.A.A.	113
SIV (AF 042335)	.T.G.-T..T.-.GTTGCAC.AG.AGG.AGTCTTGGGA.....C.GG..G.A.AA.	113
WIV (AF 025774)	.T.G.-...T.-.CGTTGCAC.AG..GG.AATCTGGGA.....C.GG..G.A.AA.	113
CzIV (AF 025775)	.T.G.C-...T.-.GTTGC.C.GG..GG...TCT.GG...G----.GG..GTAT.A.	113
IIV22 (AF 042341)	.T.A.-T..T.-.GTTGC.C.GG..GG.A.T.TGGGT..CG----.AGG..GTAT.A.	113
IIV22 (M 32799)	.T.A.-T..T.-.GTTGC.C.GG..GG.A.T.TGGGT..CG----.AGG..GTAT.A.	113
TIV (M 33542)	.T.A.-T..T.-.GTTGC.C.GG..GG.A.T.TGGGT..CG----.AGG..GTAT.A.	113
LCDV-1 (L 63545)	.A.G..A.....-G...GAC.A.A..GG.A.G----.A.CTG.AAAA	103
	* *	
GbIV (AF 247641)	CCTTAAT-TTGCCATTACCCCTTCTCTTTTTCACGTATTCTGGAGTTGCTCTTCTACTG	178
CIV (M 99395)	.T.G.....-.....G.....C.....	178
IIV31 (AF 042337)	T..G...-C.T.C.....G.....C..CA.A.....GT.....A....	178
PjIV (AF 042338)	T..G...-C.T.C.....G.....C..CA.A.....GT.....A....	178
IIV29 (AF 042339)	T.....C-.A.CC.T.A.....T.C.TA.A.....T.A.....A.....	172
AgIV (AF 042343)	T.....C-.A.CC.T.A.....T.C.TA.A.....T.A.....A.....	172
IIV30 (AF 042336)	T.....C-.A.CC.T.A.....T.C.TA.A.....T.A.....A.....	172
IIV24 (AF 042340)	TT.A.....-A.T.G.A.....T.C.TA.A.....T.C.AT.A.....A.....	172
BbIV (AF 042342)C-.....C.T.A.A.T.....C.T.A.A.....T.....A.A.A.....	172
SIV (AF 042335)-.....C.T.....T.....CA.A.....A.....T.A.....A.....A.....	172
WIV (AF 025774)-.....A.C.T.....T.....A.A..CA.....T.A.....A.G.A.....	172
CzIV (AF 025775)-.....A.TC.T.A.A.T.....T.....A.....T.....C.....G.....	172
IIV22 (AF 042341)-C.T...C.T.A.A.T.....C.T.A.A.....T.A.A.A.A.A.A.....	172
IIV22 (M 32799)-C.T...C.T.A.A.T.....C.T.A.A.....T.A.A.A.A.A.A.....	172
TIV (M 33542)-C.T...C.T.A.A.T.....C.T.A.A.....T.A.A.A.A.A.A.....	172
LCDV-1 (L 63545)	TT...G.G..A.....G.AT.....TA.G..CAGC..T.....AT.G...G..	172
	* *	
GbIV (AF 247641)	CTGCTTTGCCATACAATGAAATGAGAATTAAT-TTCCAATCCATGACTGGCAACGCTTG	237
CIV (M 99395)-.....G.....	237
IIV31 (AF 042337)	.A...C.T.C.....C.C-.....G...AGA...G.T.AGC.C	237
PjIV (AF 042338)	.A...C.C.C.....C.C-.....G...AGA...T...G.T.AGC.C	237
IIV29 (AF 042339)	.A...A.T.....G...CA.....C-..TA.C.TAGA..T...ACTGAAC.A	231
AgIV (AF 042343)	.A...A.T.....G...CA.....C-..TA.C.TAGA..T...ACTGAAC.A	231
IIV30 (AF 042336)	.A...A.T.....G...CA.....C-..TA.C.TAGA..T...ACTGAAC.A	231
IIV24 (AF 042340)	.A...A.T.....G...CA.....C-..TA.T.TAGA..T...ACTGAA..A	231
BbIV (AF 042342)	...C.C.T.....G...CA...C-C-..TA.C.TAGA..T...TGAA..	231
SIV (AF 042335)	...G.A.T...T...G...CA.....C-..TA.T.TAGA..T...ACCGAA..	231
WIV (AF 025774)	...T...T...G...CA.....C-..TA.T.TAGA..T...ACCGAA..	231
CzIV (AF 025775)	...A.A.C.T.....G...CA...C.C-..TA.T...AGA..T...CCGAA..A	231
IIV22 (AF 042341)	...C.A.T.....G...CA...C.C-..TA.T...AGA..T...TGAGC.T	231
IIV22 (M 32799)	...C.A.T.....G...CA...C.C-..TA.T...AGA..T...TGAGC.T	231
TIV (M 33542)	...C.A.T.....G...CA...C.C-..TA.T...AGA..T...TGAGC.T	231
LCDV-1 (L 63545)	.A..AC.T...T...C.....A-AG...CG...T...TC.TAGA..T.ATACGGAA..A	222
	*** *	

FIG. 5. Alignment of the MCP gene PCR product from GbIV with the corresponding GenBank sequences from 14 selected invertebrate iridovirus isolates and the fish iridovirus Lymphocystis disease virus (LCDV-1). GenBank accession numbers are given in parentheses. Dots symbolize sequence similarities to the GbIV MCP gene; dashes mark introduced sequence gaps to achieve optimal alignment. Note the close correspondence between the sequences of GbIV and CIV.

IRIDESCENT VIRUS FROM *Gryllus bimaculatus*

GbIV (AF 247641)	TTGATTCTTGACAACATTGCAGCCGTTGCATC--ACAACTGT-TGTACCTGTTGTAGGT	294
CIV (M 99395)C-----	294
IIV31 (AF 042337)	C.A..C..C.....CAACT.T.CG..G.--T.GT.....A..T...	294
PjIV (AF 042338)	C.A..C..C.....CAATT.T.CG..G.--T.GT.....A..G...	294
IIV29 (AF 042339)	C.TG....ACA..T.G...TTTA..CC.TC.GGCA.GC.CA.A..T..AA....-	290
AgIV (AF 042343)	C.TG....ACA..T.G...TTTA..CC.TC.GGCA.GC.CA.A..T..AA....-	290
IIV30 (AF 042336)	C.TG....ACA..T.G...TTTA..C.TC.TGCG.GC.CA.A..C..AA....-	290
IIV24 (AF 042340)	C.TG..T.AACA..T.G...TTTA.C.C.TC.AGCA.GT.CA.A..T..A.A.C-A..	290
BbIV (AF 042342)AACA..T.G...TTTG...C..C.AGCA.GC.CA.A..T..AA.CAA-TA.	290
SIV (AF 042335)	C.AG..T.AC.A..T.G...TCTG..A..C.TGCA.GT.CT.A..T..AA....-	290
WIV (AF 025774)	C.AG..T.AC.A..T.G...TCTT..A..C.GGCA.GT.CT.A..T..AA....-	290
CzIV (AF 025775)	..A..T.AACA..T.C...TTTG...C..C.AGC..GT.CT.A..T..AA....-	290
IIV22 (AF 042341)T.GACT...G...TCTA..AC..C.AGCA.GT.CA.A..T..AA....-T..	290
IIV22 (M 32799)T.GACT...G...TCTA..AC..C.AGCA.GTCA.A..TT.AA....-T..	290
TIV (M 33542)T.GACT...G...TCTA..AC..C.AGCA.GT.CA.A..T..AA....-T..	290
LCDV-1 (L 63545)	C.T...T...G...AAACAAGA...T.C.-----A..A...AA..AC..C.	270

* * * * *

GbIV (AF 247641)	GCTACAAGCGATATTGCGACGGCTCCTGTCTTCATCATGGAACGTATGGGGTAACTAT	354
CIV (M 99395)T.....	354
IIV31 (AF 042337)	..G.GGCT...C..TCA.....CA.CTCC..C.CTG...T.....C.....C	354
PjIV (AF 042338)	..GG.TGCT...C..TCA.....CA.CTCC..C.CTG...T.....C..G..C	354
IIV29 (AF 042339)	T.--..CTC..C..A.A..T.....T.AGGA.C..TTCAA.....CC.....	348
AgIV (AF 042343)	T.--..CTC..C..A.A..T.....T.AGGA.C..TTCAA.....CC.....	348
IIV30 (AF 042336)	T.--..CTC..C..A.A..T.....T.AGGA.C..TTCAA.....C.....	348
IIV24 (AF 042340)	T.--..CTC.CC..A.A..T.....T.AGG.TC..T.CAA.....C...T...	348
BbIV (AF 042342)	C.--..C.C..C..A.AG.T..C..A..T.GGGA.CA.TTCAA.....CC.....	348
SIV (AF 042335)	T.--..CTC..C..A.A..T..C.....GGA.CG.TTCAA.....C...T..C	348
WIV (AF 025774)	A.--..CTC..C.CA.AGTA..C..C.....GGA.CA.TTCAA.....C...T..C	348
CzIV (AF 025775)	AG--G..CTC.CC..T.AG.A..A..A.....GG.GC..TTCAA.....CA..T..C	348
IIV22 (AF 042341)	AG--GT.CTC.....T.AG.T.....A..T.AGGA.CA.TTCAA.....C.....	348
IIV22 (M 32799)	AG--GT.CTC.....T.AG.T.....A..T.AGGA.CA.TTCAA.....C.....	348
TIV (M 33542)	AG--GT.CTC.....T.AG.T.....A..T.AGGA.CA.TTCAA.....C.....	348
LCDV-1 (L 63545)	..--TG.TTT.G.A.AT.GAAA-A...A.T.AA.AG.C.TTCAA.....AT..CTA..	327

* * * * *

GbIV (AF 247641)	GCTATTGTCTCTAATGAAGAGCGAAGACGTATGGGATGCTCTGTAAGAGATATTTGGTT	414
CIV (M 99395)	414
IIV31 (AF 042337)	..A..C-----	361
PjIV (AF 042338)	..A..C-----	361
IIV29 (AF 042339)	355
AgIV (AF 042343)	355
IIV30 (AF 042336)	355
IIV24 (AF 042340)	..C.....	355
BbIV (AF 042342)	..C.....	355
SIV (AF 042335)	..C.....	355
WIV (AF 025774)	..C.....AAG...C.....A..TC.TA.A...T..TG..A.TC...C.....A..	408
CzIV (AF 025775)	..C.....T.CC..C.....A.....A.G...T..TG.CA.T.....A..	408
IIV22 (AF 042341)	..C..C-----	355
IIV22 (M 32799)	..C..C.....C..C.....A..TC.TA.A...T..TG.CA.TC...C.....A..	408
TIV (M 33542)	..C..C.....C..C.....A..TC.TA.A...T..TG.CA.TC...C.....A..	408
LCDV-1 (L 63545)	..AG.G..TA.A.....A..GC...T.....TACAA..CCTC.....A..A..G	387

** * *

GbIV (AF 247641)	GAACAA-----	420
CIV (M 99395)	420
IIV31 (AF 042337)	-----	
PjIV (AF 042338)	-----	
IIV29 (AF 042339)	-----	
AgIV (AF 042343)	-----	
IIV30 (AF 042336)	-----	
IIV24 (AF 042340)	-----	
BbIV (AF 042342)	-----	
SIV (AF 042335)	-----	
WIV (AF 025774)GGTACAA-----	420
CzIV (AF 025775)GTTCAA-----	420
IIV22 (AF 042341)	-----	
IIV22 (M 32799)GGTCAA-----	420
TIV (M 33542)GGTCAA-----	420
LCDV-1 (L 63545)GTTCAAAGTGCGCCAAACATGTATTT	420

FIG. 5—Continued

amino acids with aliphatic side chains in the corresponding positions, indicating the close relationship between GbIV and CIV.

The calculation of a (maximal-parsimony) phylogenetic tree on the basis of the reported MCP gene sequences (Fig. 7) complements and supports the findings of Webby and Kalmakoff (1998). Therefore, GbIV can be classified as a new member of group II within the genus *Iridovirus*. The type species of this genus is CIV (IIV6), which was originally isolated by Fukaya and Nasu (1966) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* (Lepidoptera). CIV is believed to be distinct from other members of this genus, because it is, among its other characteristics, serologically and genetically different from all other invertebrate iridoviruses examined so far (Kelly *et al.*, 1979; Williams and Cory, 1994; Webby and Kalmakoff, 1998). Further studies should reveal whether GbIV and CIV are serologically related isolates. IIV31 and PjIV represent group I within the genus *Iridovirus*. Group III comprises the rest of the investigated isolates of this study, namely AgIV, IIV29, IIV30, IIV24, SIV, WIV, TIV, IIV22, BbIV, and CzIV.

We have described an invertebrate cytoplasmic DNA virus from *G. bimaculatus*, termed *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV), which can be classified as a member of group II within the genus *Iridovirus*. Kleespies *et al.* (1999) have recently reported the isolation of an iridescent virus, cricket iridovirus (CrIV), from *Gryllus campestris* L. and *Acheta domesticus* L. Their CrIV-infected animals originated from commercially produced colonies in The Netherlands. The authors have shown morphological data and results from digestion of viral DNA with the endonuclease *EcoRI*. The data reported so far indicate that CrIV and GbIV might have some common features and perhaps represent different strains of one virus species. To clarify the relationship between these two viruses, we have tried to obtain an aliquot of CrIV, but unfortunately we have not succeeded so far. Therefore, future experiments are required to establish whether GbIV is a new species within the genus *Iridovirus* or just an isolate of a previously known virus species.

GbIV	FTTPASKAVG YDNMIGNISA LIQPQVPVPL	30
CIVV.....A	30
GbIV	PATVSLPEAD LNLPLPFFFS RDSGVALPTA	60
CIV	60
GbIV	ALPYNEMRIN FQFHDWQRLI ILDNIAAVAS	90
CIV	90
GbIV	QTVVPPVVGAT SDIATAPVLH HGTVWGNVYAI	120
CIV	120
GbIV	VSNEERRRMG CSVRDILVEQ	140
CIV	140

FIG. 6. Amino acid sequence alignment of the partial major capsid protein from *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV) and Chilo iridescent virus (CIV). Dots represent residues identical to that of the GbIV protein.

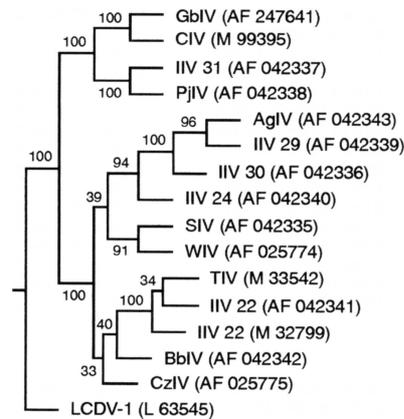


FIG. 7. Phylogenetic tree based on the iridovirus MCP gene fragment sequences illustrated in Fig. 5 (maximal DNA parsimony). The LCDV-1 gene sequence has been used as an outgroup. The values on each branch represent percentage bootstrap support (from 100 replicates) for maximum-parsimony.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Prof. Dr. Winfried Ahne for helpful assistance, discussions, and critical review. This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft: Ah 18/15-3.

REFERENCES

- Ahne, W., Bremont, M., Hedrick, R. P., Hyatt, A. D., and Whittington, R. J. 1997. Special topic review: Iridoviruses associated with epizootic haematopoietic necrosis (EHN) in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 367-373.
- Ahne, W., Bearzotti, M., Bremont, M., and Essbauer, S. 1998. Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with epizootic haematopoietic necrosis virus and frog virus 3. *J. Vet. Med. B* **45**, 373-383.
- Bahr, U., Tidona, C. A., and Darai, G. 1997. The DNA sequence of Chilo Iridescent Virus between the genome coordinates 0.101 and 0.391: Similarities in coding strategy between insect and vertebrate iridoviruses. *Virus Genes* **15**, 235-245.
- Bailey, L., Ball, B. V., and Woods, R. D. 1976. An iridovirus from bees. *J. Gen. Virol.* **31**, 459-461.
- Black, P. N., Blair, C. D., Butcher, A., Capinerga, J. L., and Happ, G. M. 1981. Biochemistry and ultrastructure of iridescent virus type 29. *J. Invertebr. Pathol.* **38**, 12-21.
- Carey, G. P., Lescott, T., Robertson, J. S., Spencer, L. K., and Kelly, D. C. 1978. Three African isolates of small iridescent viruses: Type 21 from *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), type 23 from *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae) and type 28 from *Lethocerus columbiae* (Hemiptera Heteroptera: Belostomatidae). *Virology* **85**, 307-309.
- Cameron, I. R. 1990. Identification and characterization of the gene encoding the major structural protein of the insect iridescent virus type 22. *Virology* **178**, 35-42.
- Cerutti, M., and Devauchelle, G. 1990. Protein composition of chilo iridescent virus. In "Molecular Biology of Iridoviruses" (G. Darai, Ed.), pp. 81-111. Kluwer Academic, Boston.

- Cole, A., and Morris, T. J. 1980. A new iridovirus of two species of terrestrial isopods, *Armadillidium vulgare* and *Porcellio scaber*. *Intervirology* **14**, 21–30.
- Devauchelle, G., Attias, J., Monnier, C., Barray, S., Cerutti, M., Guerillon, J., and Orange-Balange, N., 1985. Chilo iridescent virus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **116**, 37–48.
- Federici, B. A. 1980. Isolation of an iridovirus from two terrestrial isopods, the pill bug, *Armadillidium vulgare*, and the sow bug, *Porcellio dilatatus*. *J. Invertebr. Pathol.* **36**, 373–381.
- Fukaya, M., and Nasu, S. 1966. A Chilo iridescent virus (CIV) from the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera, Pyralidae). *Appl. Entomol. Zool.* **1**, 69–76.
- Goorha, R., Granoff, A., Willis, D., and Murti, G. 1984. The role of DNA methylation in virus replication: Inhibition of FV3 replication by 5-azacytidine. *Virology* **138**, 94–102.
- Heppell, J., and Berthiaume, L. 1992. Ultrastructure of lymphocystis disease virus (LDV) as compared to frog virus 3 (FV3) and chilo iridescent virus (CIV): Effects of enzymatic digestions and detergent degradations. *Arch. Virol.* **125**, 215–226.
- Kalmakoff, J., and Robertson, J. S. 1970. Serological relationship of *Wiseana* iridescent virus (WIV) to other iridescent viruses. *Proc. Univ. Otago Med. Sch.* **48**, 16–18.
- Kalmakoff, J., Moore, S. G., and Pottinger, R. P. 1972. An iridescent virus from the grass grub *Costelytra zealandica*: Serological study. *J. Invertebr. Pathol.* **20**, 70–76.
- Kelly, D. C. 1985. Insect iridescent viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **116**, 23–35.
- Kelly, D. C., and Vance, D. E. 1973. The lipid content of two iridescent viruses. *J. Gen. Virol.* **21**, 417–423.
- Kelly, D. C., Ayres, M. D., Lescott, T., Robertson, J. S., and Happ, G. M. 1979. A small iridescent virus type 29 isolated from *Tenebrio molitor*: A comparison of its proteins and antigens with six other iridescent viruses. *J. Gen. Virol.* **42**, 95–105.
- Kleespies, R. G., Tidona, C. A., and Darai, G. 1999. Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range. *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 84–90.
- Lacey, L. A., and Adams, J. R. 1994. An iridescent virus from *Popillia japonica* (Col.: Scarabaeidae). *Entomophaga* **39**, 131–136.
- Linkey, and Nielsen. 1968. Transmission of a mosquito iridescent virus in *Aedes taeniorhynchus*. *J. Invertebr. Pathol.* **12**, 7–24.
- Mao, J., Hedrick, R. P., and Chinchar, V. G. 1997. Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology* **229**, 212–220.
- Moore, N. F., and Kelly, D. C. 1980. A comparative study of the polypeptides of three iridescent viruses by N-terminal analysis, amino acid analysis, and surface labeling. *J. Invertebr. Pathol.* **36**, 415–422.
- Stadelbacher, E. A., Adams, J. R., Faust, R. M., and Tompkins, G. I. 1978. An iridescent virus of the bollworm *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* **32**, 71–76.
- Steinhouse, E. A., and Leutenegger, R. 1963. Icosahedral virus from a scarab (*Sericesthis*) [iridovirus]. *J. Insect Pathol.* **5**, 246–248.
- Stoltz, D. B. 1971. The structure of icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. Ultrastruct. Res.* **37**, 219–239.
- Strohwasser, R., Raab, K., Schnitzler, P., Janssen, W., and Darai, G. 1993. Identification of the gene encoding the major capsid protein of insect iridescent virus type 6 by polymerase chain reaction. *J. Gen. Virol.* **74**, 873–879.
- Tajbakhsh, S., Lee, P. E., Watson, D. C., and Seligy, V. L. 1990. Molecular cloning, characterization and expression of the *Tipula* iridescent virus capsid gene. *J. Virol.* **64**, 125–136.
- Tidona, C. A., and Darai, G. 1997. The complete sequence of lymphocystis disease virus. *Virology* **220**, 207–216.
- Tidona, C. A., Schnitzler, P., Kehm, R., and Darai, G. 1998. Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? *Virus Genes* **16**, 59–66.
- Ward, V. K., and Kalmakoff, J. 1991. Invertebrate Iridoviridae. In "Viruses of Invertebrates" (E. Kurstak, Ed.), pp. 197–226. Dekker, New York.
- Webby, R., and Kalmakoff, J. 1998. Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. *Arch. Virol.* **143**, 1949–1966.
- Webby, R., and Kalmakoff, J. 1999. Comparison of the major capsid protein genes, terminal redundancies, and DND-DNA homologies of two New Zealand iridoviruses. *Virus Res.* **59**, 179–189.
- Williams, T. 1994. Comparative studies of iridoviruses: Further support for a new classification. *Virus Res.* **33**, 99–121.
- Williams, T. 1996. The iridoviruses. *Adv. Vir. Res.* **46**, 345–412.
- Williams, T., and Cory, J. S. 1994. Proposals for a new classification of iridescent viruses. *J. Gen. Virol.* **75**, 1291–1301.
- Williams, T., and Thompson, I. P. 1995. Fatty acid profiles of invertebrate iridescent viruses. *Arch. Virol.* **140**, 975–981.
- Williams, T., Chinchar, V. G., Darai, G., Hyatt, A., Kalmakoff, J., and Seligy, V. 2000. Iridoviridae. In "Virus Taxonomy: 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner, Eds.), Academic Press, New York, in press.
- Xeros, N. 1954. A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature* **174**, 562.

3. Eigene Untersuchungen

3.2 Ergebnisse – Teil II

F. Just, S. Essbauer, W. Ahne, S. Blahak

„Occurrence of an Invertebrate Iridescent-Like Virus (*Iridoviridae*) in Reptiles”

Journal of Veterinary Medicine B **48**: 685-694 (2001)

J. Vet. Med. B **48**, 685–694 (2001)
© 2001 Blackwell Wissenschafts-Verlag, Berlin
ISSN 0931–1793

*Institute of Zoology, Fishery Biology and Fish Diseases, Faculty of Veterinary Medicine,
Ludwig-Maximilian's University Munich, and State Veterinary Office, Detmold, Germany*

Occurrence of an Invertebrate Iridescent-Like Virus (*Iridoviridae*) in Reptiles

F. JUST^{1,4}, S. ESSBAUER², W. AHNE¹ and S. BLAHAK³

Addresses of authors: ¹Institute of Zoology, Fishery Biology and Fish Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ludwig-Maximilian's University Munich, Kaulbachstr. 37, D-80539 Munich; ²WHO Centre for Comparative Virology, Institute of Medical Microbiology, Infectious and Epidemic Diseases, Veterinärstr. 13, D-80539 Munich; ³State Veterinary Office Detmold, Westernfeldstr. 1, D-32758 Detmold, Germany; ⁴Corresponding author

With 4 figures

(Received for publication February 1, 2001)

Summary

Viral isolates were obtained in 1998, 1999 and 2000 from the lung, liver and intestine of two bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and a chameleon (*Chamaeleo quadricornis*) and from the skin of a frill-necked lizard (*Chamydosaurus kingii*) by using viper heart cells (VH2) at 28°C. Electron microscopic examination of infected VH2 cells revealed the assembly of icosahedral iridovirus-like particles measuring 139 nm (side to side) and 151 nm (apex to apex). Negatively stained virus particles had dimensions of 149 nm (side to side) and 170 nm (apex to apex). Polymerase chain reaction (PCR) amplification of purified viral DNA with primers corresponding to the partial gene encoding the major capsid protein (MCP) of *Frog virus-3* (FV-3), the type species of the genus *Ranavirus*, was unsuccessful. In contrast, primers corresponding to the partial MCP gene of *Chilo iridescent virus* (CIV; genus *Iridovirus*) amplified 500-bp products with 97% identity to the nucleotide sequence of CIV and 100% identity to the nucleotide sequence of *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV), an invertebrate iridescent virus. Virus protein profiles analysed by sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) and restriction fragment length profiles of purified viral DNA treated with the endonucleases *EcoRI*, *HindIII* and *HpaII* were identical to those of GbIV.

Introduction

Icosahedral double-stranded DNA viruses belonging to the family *Iridoviridae* are ubiquitous in nature. The family is divided into the genera *Iridovirus*, *Chloriridovirus*, *Ranavirus* and *Lymphocystivirus*. Members of the genera *Iridovirus* and *Chloriridovirus* are believed to infect invertebrates only (Kelly, 1995; Williams, 1996). In contrast, iridoviruses of the genus *Lymphocystivirus* induce tumour-like skin lesions in fish, and members of the genus *Ranavirus* mostly cause systemic diseases in poikilothermic vertebrates, e.g. fishes, frogs and reptiles (Mao et al., 1997; Ahne et al., 1998; Williams et al., 2000). In particular, *Frog virus-3* (FV-3), the type species of the genus *Ranavirus*, was isolated from a leopard frog (*Rana pipiens*) with renal adenocarcinoma. FV-3 is pathogenic to tailbuds, hatching stage embryos and tadpoles of frogs and toads (Granoff, 1989). The epizootic haematopoietic necrosis virus group (EHNV) comprises tentative members of the genus

Ranavirus (Williams et al., 2000) inducing high mortalities in fish, e.g. redbfin perch (*Perca fluviatilis*), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), sheatfish (*Silurus glanis*) and catfish (*Ictalurus melas*) (Langdon et al., 1986; Langdon and Humphrey, 1987; Pozet et al., 1992; Bovo et al., 1993; Whittington and Reddacliff, 1995; Ahne et al., 1997). *Ranavirus*-like iridoviruses have been shown to be associated with hepatitis, spleenitis, enterocolitis, liver necrosis and respiratory diseases in the Mediterranean land tortoise (*Testudo hermanni*) (Heldstab and Bestetti, 1982; Müller et al., 1988; Marschang et al., 1999), and with pharyngo-oesophageal diseases in a gopher tortoise (*Gopherus polyphemus*) (Daszak et al., 1999).

The genome of vertebrate iridoviruses is characterized by the methylation of some 20% of its cytosine residues, protecting the viral DNA from degradation by vertebrate endonucleases (Goorha et al., 1984). The genera *Iridovirus* and *Chloriridovirus* comprise iridovirus isolates that lack DNA methylation and that cause fatal diseases in invertebrates, especially in insects. More than 30 iridescent virus isolates belonging to the genus *Iridovirus* have been reported from isopods (Cole and Morris, 1980; Federici, 1980), lepidopterans (Fukaya and Nasu, 1966; Carey et al., 1978), hymenopterans (Bailey et al., 1976), dipterans (Xeros, 1954), coleopterans (Steinhouse and Leutenegger, 1963; Kalmakoff et al., 1972; Carey et al., 1978; Black et al., 1981; Lacey and Adams, 1994) and orthopterans (Kleespies et al., 1999; Just and Essbauer, 2001). However, only two of these isolates, *Invertebrate iridescent virus-1* (IIV-1, syn. *Tipula iridescent virus*, TIV) and *Invertebrate iridescent virus-6* (IIV-6, syn. *Chilo iridescent virus*, CIV) have species status within the genus, whereas the remaining isolates are listed as tentative virus species (Williams et al., 2000). Comparable taxonomic uncertainty is found with respect to the genus *Ranavirus*, which comprises exclusively the type species FV-3 and several tentative virus species (Williams et al., 2000). One major tool for the demarcation of different virus species in the family *Iridoviridae* and for the classification of new iridovirus isolates is the comparison of the nucleotide sequences of the major capsid protein (MCP) gene (Tidona et al., 1998). Polymerase chain reaction (PCR) primers that have been shown to be specific for highly conserved regions of the MCP gene have been designed and are used for routine diagnosis (Webby and Kalmakoff, 1998; Mao et al., 1999). Phylogenetic analysis of the MCP sequences revealed that iridoviruses isolated from vertebrate hosts can be clearly distinguished from invertebrate iridoviruses with PCR techniques and are classified as members of the genera *Ranavirus* and *Lymphocystivirus*, respectively (Williams et al., 2000).

The present paper describes the occurrence of iridoviruses in three different species of reptiles (*Pogona vitticeps*, *Chamaeleo quadricornis* and *Chamydosaurus kingii*) originating from various sources of animal stocks during 1998–2000. The animals had died with non-specific symptoms, except that one bearded dragon had pneumonia (1998) and the frill-necked lizard (2000) exhibited pox-like skin lesions. In this study we characterized the viral isolates on the basis of morphological and molecular biological data and on the basis of the partial nucleotide sequence of the MCP gene.

Materials and Methods

Isolation of viruses

The agents isolated by one of us (S. Blahak) came from several sources of animal stocks obtained in 1998 (bearded dragon), 1999 (frill-necked lizard) and 2000 (bearded dragon, chameleon). The viruses were separately isolated from the lung, liver, kidney and intestine of the two bearded dragons (*Pogona vitticeps*) and the chameleon (*Chamaeleo quadricornis*). Another infectious agent was isolated from the skin of a frill-necked lizard (*Chamydosaurus kingii*), which was one of a group of newly imported animals. Some of these reptiles had died showing pox-like skin lesions and starvation. Tissue specimens were removed aseptically and homogenized. Bacteria-free organ suspensions were inoculated into monolayers of viper heart cells (VH2, ATCC CCL 140) and incubated at 28°C. The cultures were checked daily for cytopathogenic effects.

In further experiments, aliquots of the first virus passage were inoculated into monolayers of the insect cell line sf-9 (derived from pupal ovarian tissue of *Spodoptera frugiperda*; Invitrogen, Groningen, The Netherlands), according to the protocol described elsewhere (Just and Essbauer, 2001).

The invertebrate iridescent virus GbIV was recently isolated from commercially produced stocks of *Gryllus bimaculatus* in Germany (Just and Essbauer, 2001) and was used as a reference virus in this study.

Partial purification of viruses

Infectious tissue culture supernatants were clarified by low-speed centrifugation (5000g, 15 min) and the viruses were pelleted by ultracentrifugation (35 000g, 90 min). The viral pellets were resuspended in 400 μ l of distilled water and stored at -20°C until use (Sambrook et al., 1989).

Electron microscopy

Infected VH2 cells were incubated for 2 h at 4°C in 5% glutaraldehyde, 4% formaldehyde, buffered with 0.1 M Na-phosphate to pH 7.4, washed with 0.1 M Na-phosphate buffer and post-fixed for 2 h in 1% OsO_4 in 0.1 M Na-phosphate buffer. All specimens were stained for 90 min with 2% aqueous uranyl acetate, dehydrated in graded ethanol and embedded in ERL 4206 (Spurr, 1969). The blocks were sectioned on an Ultracut microtome (Reichert-Jung, Nußloch, Germany), stained with KMnO_4 and lead citrate (Plattner and Zingsheim, 1987) and examined with a transmission electron microscope EM 109 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 80 kV.

For negative staining a 5- μ l aliquot of the purified virus solution was stained for 5 s with the same volume of 2% phosphotungstic acid on pioloform-coated copper grids, dried, and examined at 80 kV.

Protein gel electrophoresis

Aliquots of the purified virus isolates were diluted in Laemmli's dissociation buffer, boiled for 5 min, and loaded on 10% sodium dodecyl sulphate (SDS) polyacrylamide gels. Viral polypeptides were separated at 35 mA constant current and detected by Coomassie blue staining.

Isolation of viral DNA

Aliquots of 100 μ l of purified virus suspension were digested overnight in 1% SDS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ proteinase K (Roth, Karlsruhe, Germany), 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ribonuclease A (Roth) at 37°C . DNA was extracted with phenol, precipitated in ethanol, resuspended in 30 μ l of distilled water and stored at -20°C until required for restriction endonuclease digestion. DNA for PCR was isolated from 200 μ l of cell culture supernatants using the QIA amp blood DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Restriction endonuclease digestion of viral DNA

The restriction enzymes *EcoRI*, *HindIII* and *HpaII* were obtained from AGS (Heidelberg, Germany) and the digestion reactions were carried out according to the manufacturer's instructions. Restriction fragments were separated on 0.7% agarose gels at 20 V constant voltage and stained with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide (Sambrook et al., 1989).

PCR and sequencing

Amplification of viral DNA was carried out with two sets of primers corresponding to the partial gene of the MCP of either FV-3 (genus *Ranavirus*) or CIV (genus *Iridovirus*); 50 ng of viral

DNA was added to 100 μ l of PCR solution containing 10 mM TRIS/HCl, 50 mM KCl, pH 8.3, 0.75 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 2 pmol/ μ l primer, and 0.025 U/ μ l *Taq* polymerase (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany). The sequences of the individual primers were: FV-3-MCP forward primer: 5'-GAC TTG GCC ACT TAT GAC-3'; FV-3-MCP reverse primer: 5'-TTA NAA RAY NGG RAA NCC CAT-3' (Mao et al., 1997, 1999); CIV-MCP forward primer: 5'-ACC ATT ACA TTT AAT GAT TTG G-3'; CIV-MCP reverse primer: 5'-TTT TGA CGT GGT GCA GTT TGA AC-3' (Webby and Kalmakoff, 1998). The PCR products were purified with the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions and sequenced by the GATC Sequencing Service (Konstanz, Germany).

Results

Isolation of virus

VH2 cells inoculated with the tissue homogenates exhibited hypertrophy, vacuolization and cell lysis within 7 days of incubation at 28°C. The virus titres obtained ranged between 10⁴ and 10⁵ TCID₅₀/ml. Chloroform treatment of the bearded dragon isolate (1998) resulted in a drop in the infectivity titres of more than 2 log₁₀ indicating susceptibility of the virus to lipid solvents (Kelly and Vance, 1973). Inoculation of the first virus passage of the bearded dragon isolate into monolayers of the insect cell line sf-9 revealed identical cytopathogenic effects. Titration of the virus from these cultures resulted in titres of 10⁷ TCID₅₀/ml.

Electron microscopy

All virus isolates investigated in this study were of an identical size and ultrastructure. Figure 1 illustrates the results in ultrathin-sectioned and negatively stained material. Ultrathin sections of infected VH2 cells revealed the assembly of icosahedral particles with mean sizes ($n = 100$) of 139 \pm 6 nm (side to side) and 151 \pm 5 nm (apex to apex) in the cytoplasm (Fig. 1a,b,d). Negatively stained preparations of purified virus exhibited particles measuring 149 \pm 6 nm (side to side) and 170 \pm 8 nm (apex to apex) (Fig. 1c). The particles consisted of an electron-dense core, which was surrounded by a lipid bilayer (Fig. 1d, arrowhead), and amorphous electron-dense material forming the 10-nm thick outer part of the shell.

SDS-PAGE of viral proteins

Gel electrophoresis of viral proteins separated more than 20 polypeptides with one major species of approximately 50 kDa. The direct comparison of the bearded dragon isolate (1998) with the reference GbIV revealed identical virus protein profiles (Fig. 2, lanes 2 and 3).

Restriction endonuclease analysis

Purified DNA of the bearded dragon isolate (1998) was digested with the restriction endonucleases *Eco*RI, *Hind*III and *Hpa*II and the restriction fragment length profiles were compared with the corresponding profiles of GbIV. The analysis illustrated in Fig. 3 clearly demonstrates the identity of the profiles of both viruses. The digestion of viral DNA with *Hpa*II resulted in more than 20 DNA fragments indicating that the DNA of neither of the virus isolates is methylated (Fig. 3, lanes 3 and 6).

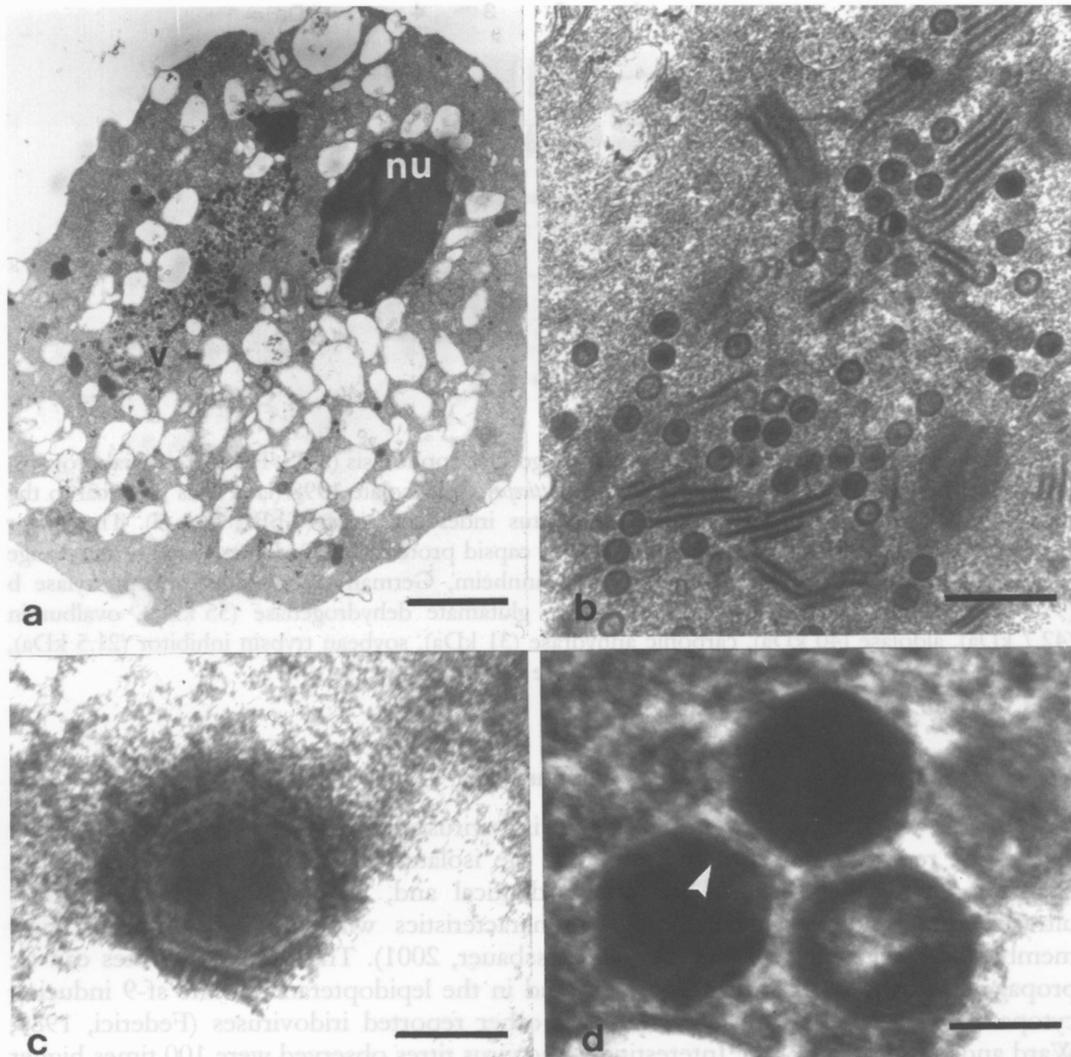


Fig. 1. (a) Ultrathin section through a VH2 cell infected with bearded dragon (*Pogona vitticeps*) virus isolate 1998. Numerous virus particles (v) are located in the cytoplasm near the nucleus (nu); bar: 3 μm . (b) Assembly of the icosahedral virus particles in a VH2 cell at higher magnification; bar: 675 nm. (c) Negatively stained virus particle purified by ultracentrifugation; bar: 100 nm. (d) Ultrathin section through intracellular virus particles. The inner part of the virus shell consists of a lipid bilayer (arrowhead); bar: 100 nm.

PCR amplification of viral DNA

FV-3-specific MCP PCR (Mao et al., 1999) did not amplify the DNA of the viruses investigated (data not shown). In contrast, approximately 500-bp fragments were obtained from all virus isolates by using the invertebrate iridovirus-specific MCP primers designed for CIV (Webby and Kalmakoff, 1998) (Fig. 4). BLAST (Altschul et al., 1997) search results and alignments indicated sequence homology of 97% to the partial MCP gene of CIV (IIV-6; GenBank Accession no. M99395) and 100% homology to the partial MCP gene of GbIV (GenBank Accession no. AF247641). CLUSTAL W 1.8 multiple sequence alignment (EMBL; Thompson et al., 1994) revealed that the partial MCP (500 bp) sequences of the iridoviruses isolated from both the bearded dragons, the chameleon and the frill-necked lizard have 100% identity.

690

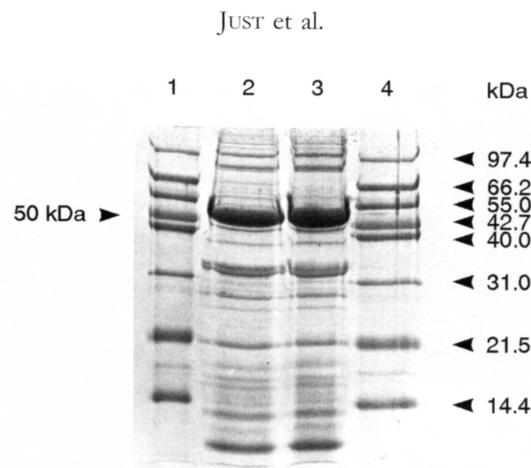


Fig. 2. Sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) of viral proteins. The protein profile of bearded dragon (*Pogona vitticeps*) virus isolate 1998 (lane 2) is identical to the profile of the reference virus *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV; lane 3). The major polypeptide band at 50 kDa represents the major capsid protein (MCP). Lanes 1 and 4, mid-range protein molecular weight marker (Promega, Mannheim, Germany) containing phosphorylase b (97.4 kDa), bovine serum albumin (66.2 kDa), glutamate dehydrogenase (55 kDa), ovalbumin (42.7 kDa), aldolase (40 kDa), carbonic anhydrase (31 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), and lysozyme (14.4 kDa).

Discussion

In this work we describe invertebrate iridoviruses which appear in three different species of reptiles. Our data indicate that the isolates from two bearded dragons, a chameleon and a frill-necked lizard are identical and, furthermore, that they share ultrastructural and molecular biological characteristics with GbIV, a tentative new member of the genus *Iridovirus* (Just and Essbauer, 2001). The reptilian isolates can be propagated in the reptilian cell line VH2 and in the lepidopteran cell line sf-9 inducing cytopathogenic effects similar to those of other reported iridoviruses (Federici, 1980; Ward and Kalmakoff, 1991). Interestingly, the virus titres observed were 100 times higher in sf-9 insect cells than in the reptilian cell line VH2 indicating that viral replication conditions might be better in the insect cells. With sizes of 149 nm (side to side) and 170 nm (apex to apex) in negatively stained material, the icosahedral particles of reptilian origin exhibit the typical dimensions of small invertebrate iridoviruses, e.g. GbIV or CIV (genus *Iridovirus*). They also possess iridovirus-specific ultrastructure with an electron-dense core, which is surrounded by an internal lipid membrane and a proteinaceous outer shell (Heppell and Berthiaume, 1992; Williams, 1996). Our data from SDS–PAGE of viral proteins and restriction endonuclease digestion of viral DNA support the hypothesis that the reptilian isolates are indeed invertebrate iridoviruses. The viral protein profile exhibits a major protein species of approximately 50 kDa (Fig. 2) that might correspond to the MCP of iridoviruses (Moore and Kelly, 1980). Furthermore, the digestion of viral DNA with the restriction endonuclease *Hpa*II reveals that the DNA is not methylated; this is in contrast to the characteristics of vertebrate iridoviruses (Williams et al., 2000).

Invertebrate iridoviruses are present in several orders of insects and crustaceans and are believed to be restricted to their invertebrate hosts. Nevertheless, arthropods may act as hosts to a variety of viruses infecting exclusively arthropods, animals other than arthropods and even plants (Bellet, 1969; Gray and Banerjee, 1999). An example of transmission cycles involving vertebrates and invertebrates is the *African swine fever virus* (ASFV; *Asfarviridae*, genus *Asfivirus*), previously classified as a member of the family *Iridoviridae*. ASFV, which has clear similarities in morphology with iridoviruses but a distinct genomic organization, is transmitted by contact, by infected meat and

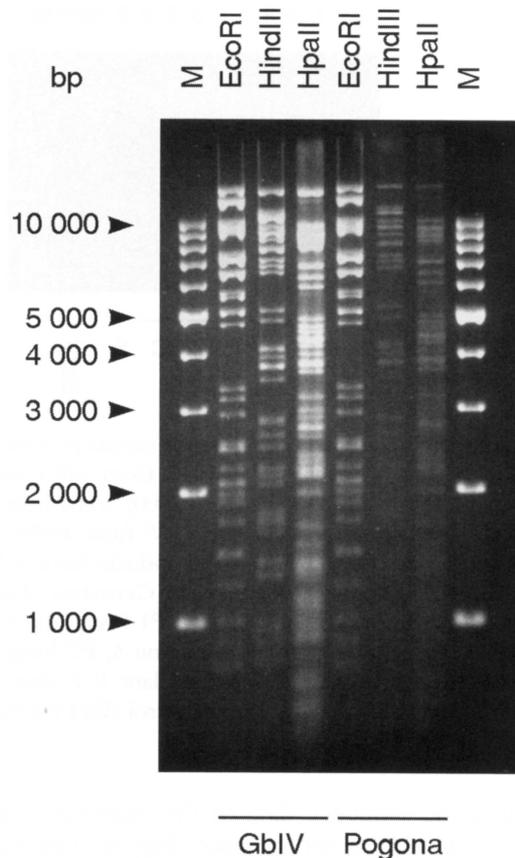


Fig. 3. Restriction fragment length profiles of DNA from *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV) and bearded dragon (*Pogona vitticeps*) virus isolate 1998 digested with *EcoRI*, *HindIII* and *HpaII*. The corresponding profiles are identical. The sizes of the DNA fragments are given in base pairs. M, 1-kb DNA ladder (Promega, Mannheim, Germany).

mechanically by biting flies and soft ticks of the order *Ornithodoros*. ASFV can be transmitted transtadially, transovarially and sexually between ticks (Costa, 1990; Endris and Hess, 1994; Murphy et al., 1995; Kleiboeker et al., 1998, 1999). Insectivorous reptiles in culture are fed on insects, e.g. crickets, cockroaches and locusts. The food insects are raised and distributed by commercial producers. However, invertebrate iridoviruses have been isolated from various stocks of crickets (Boucias et al., 1987; Fowler, 1989; Kleespies et al., 1999; Just and Essbauer, 2001). Toads fed with grasshoppers inoculated with the tadpole oedema virus (genus *Ranavirus*) have been shown to have the virus in their stomach tissue and skeletal muscle 37 days after feeding (Wolf et al., 1968). Intraperitoneal injections of large doses of native or ultraviolet-irradiated CIV (genus *Iridovirus*) are lethal to frogs and mice, whereas injections of heat- or antiserum-inactivated CIV have no effect (Ohba and Aizawa, 1981, 1982). Furthermore, CIV replicates in vertebrate cell lines, e.g. a viper spleen cell line (VSW; McIntosh and Kimura, 1974). One might reasonably expect the transmission of invertebrate iridoviruses to insectivorous reptiles to occur via infected food insects. However, there is no firm evidence for this hypothesis to date. Our paper describes, for the first time, the identification of invertebrate iridoviruses in reptiles by the direct amplification and sequencing of gene fragments of their MCP. The PCR technique, with regard to the highly conserved regions of the MCP gene, has proved to be a useful tool in providing information about the genetic spectrum of iridoviruses isolated from a variety of hosts (Tidona et al., 1998; Webby and Kalmakoff, 1998). In the present

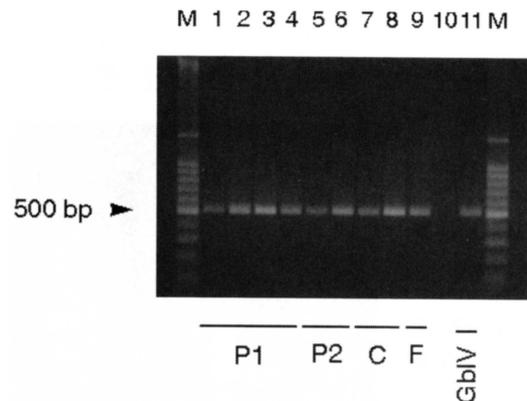


Fig. 4. Agarose gel (1.5%) electrophoresis of partial major capsid protein (MCP) gene polymerase chain reaction (PCR) products from virus DNA isolated from cell culture supernatants of two bearded dragons (*Pogona vitticeps*) (P1 from 1998; P2 from 2000), a chameleon (*Chamaeleo quadricornis*) (C from 2000), a frill-necked lizard (*Chamydosaurus kingii*) (F from 1999) and the reference isolate *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV). All PCR products have a length of approximately 500 bp. M, 100-bp DNA ladder (Promega, Mannheim, Germany). Lane 1, P1 pooled organ suspension (lung, liver, intestine); lane 2, P1 lung; lane 3, P1 liver; lane 4, P1 intestine; lane 5, P2 pooled organ suspension (lung, liver, kidney, intestine); lane 6, P2 lung; lane 7, C pooled organ suspension (lung, liver, kidney, intestine); lane 8, C kidney; lane 9, F skin; lane 10, negative control (distilled water); lane 11, positive control (GbIV DNA).

study we have shown that the sequence data of the amplicons obtained from the viral DNA isolated from various tissues of two bearded dragons, one chameleon and one frill-necked lizard (Fig. 4) have 97–100% identity to the partial MCP gene of invertebrate iridoviruses. In order to confirm the results, we repeated our investigations, returning to the original isolates obtained and kept in the laboratory at Detmold, i.e. a different place from that where the PCR amplification was carried out (Munich). In the second trial, we obtained the same results as in the first study.

It appears that invertebrate iridoviruses might be transmitted to reptiles via the insects on which they feed. The question regarding the manner in which the invertebrate iridoviruses affect poikilothermic vertebrates and whether further genetic diversity exists between the viruses in the hosts could not be answered in this study. Because invertebrate iridoviruses are regarded as candidates for the biological control of insect pests (Kleespies et al., 1999), one must be aware that they may have a wide host spectrum and possibly are able to jump from invertebrates to vertebrates.

Acknowledgements

This study was partially supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (AH 18/15). We thank Carolin Dennert for providing the frill-necked lizard.

References

- Ahne, W., M. Bearzotti, M. Bremont, and S. Essbauer, 1998: Comparison of European systemic piscine and amphibian iridoviruses with Epizootic Haematopoietic Necrosis Virus and Frog Virus 3. *J. Vet. Med. B* **45**, 373–383.
- Ahne, W., M. Bremont, R. P. Hedrick, A. D. Hyatt, and R. J. Whittington, 1997: Special topic review: Iridoviruses associated with EHN in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 367–373.

- Altschul, S. F., T. L. Madden, A. A. Schäffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. J. Lipman, 1997: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3389–3402.
- Bailey, L., B. V. Ball, and R. D. Woods, 1976: An iridovirus from bees. *J. Gen. Virol.* **31**, 459–461.
- Bellet, A. J. D., 1969: Relationships among polyhedrosis and granulosis virus of insects. *Virology* **37**, 117–127.
- Black, P. N., C. D. Blair, A. Butcher, J. L. Capinerga, and G. M. Happ, 1981: Biochemistry and ultrastructure of iridescent virus type 29. *J. Invertebr. Pathol.* **38**, 12–21.
- Boucias, D. G., J. E. Maruniak, and J. C. Pendland, 1987: Characterization of an iridovirus from the southern mole cricket, *Scapteriscus vicinus*. *J. Invertebr. Pathol.* **50**, 238–245.
- Bovo, G., M. Comuzi, S. DeMas, G. Ceschia, G. Giorgetti, P. Giacometti, and E. Cappelozza, 1993: Isolamento di un agente virale irido-like da pesce gatto (*Ictalurus melas*) d'allevamento. *Boll. Soc. It. Patol. Ittica.* **11**, 3–10.
- Carey, G. P., T. Lescott, J. S. Robertson, L. K. Spencer, and D. C. Kelly, 1978: Three African isolates of small iridescent viruses: type 21 from *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), type 23 from *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae) and type 28 from *Lethocerus columbiae* (Hemiptera Heteroptera: Belostomatidae). *Virology* **85**, 307–309.
- Cole, A., and T. J. Morris, 1980: A new iridovirus of two species of terrestrial isopods, *Armadillidium vulgare* and *Porcellio scaber*. *Intervirology* **14**, 21–30.
- Costa, J. V., 1990: African swine fever. In: Darai, G. (ed.), *Molecular Biology of Iridoviruses*, pp. 247–270. Kluwer Academic, Boston.
- Daszak, P., L. Berger, A. A. Cunningham, A. D. Hyatt, D. E. Green, and R. Speare, 1999: Emerging infectious diseases and amphibian population declines. *Emerging Inf. Dis.* **5**, 735–748.
- Endris, R. G., and W. R. Hess, 1994: Attempted transovarial and veneral transmission of African swine fever virus by the Iberian soft tick *Ornithodoros* (Pavlovskyella) *maroccanus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae). *J. Med. Entomol.* **31**, 373–381.
- Federici, B. A., 1980: Isolation of an iridovirus from two terrestrial isopods, the pill bug, *Armadillidium vulgare*, and the sow bug, *Porcellio dilatatus*. *J. Invertebr. Pathol.* **36**, 373–381.
- Fowler, H. G., 1989: Natural microbial control of cricket populations (Orthoptera: Gryllotalpidae: *Scapteriscus borelli*): regulation of populations aggregated in time and space. *Rev. Brasil. Bio.* **49**, 1039–1051.
- Fukaya, M., and S. Nasu, 1966: A Chilo iridescent virus (CIV) from the rice stem borer *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera, Pyralidae). *Appl. Ent. Zool.* **1**, 69–76.
- Goorha, R., A. Granoff, D. Willis, and G. Murti, 1984: The role of DNA methylation in virus replication: inhibition of FV3 replication by 5-azacytidine. *Virology* **138**, 94–102.
- Granoff, A., 1989: Viruses of amphibia: an historical perspective. In: Ahne, W., and E. Kurstak (eds), *Viruses of Lower Vertebrates*, pp. 3–12. Springer, Heidelberg.
- Gray, S. M., and N. Banerjee, 1999: Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 128–148.
- Heldstab, A., and G. Bestetti, 1982: Spontaneous viral hepatitis in a spur-tailed Mediterranean land tortoise (*Testudo hermanni*). *J. Zoo Anim. Med.* **13**, 113–120.
- Heppell, J., and L. Berthiaume, 1992: Ultrastructure of lymphocystis disease virus (LCDV) as compared to frog virus 3 (FV-3) and chilo iridescent virus (CIV): effects of enzymatic digestions and detergent degradations. *Arch. Virol.* **125**, 215–226.
- Just, F., and S. Essbauer, 2001: Characterization of an iridescent virus isolated from *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera: Gryllidae). *J. Invertebr. Pathol.* **77**, 51–61.
- Kalmakoff, J., S. G. Moore, and R. P. Pottinger, 1972: An iridescent virus from the grass grub *Costelytra zealandica*: serological study. *J. Invertebr. Pathol.* **20**, 70–76.
- Kelly, D. C., 1995: Insect iridescent iridoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **116**, 23–35.
- Kelly, D. C., and D. E. Vance, 1973: The lipid content of two iridescent viruses. *J. Gen. Virol.* **21**, 417–423.
- Kleespies, R. G., C. A. Tidona, and G. Darai, 1999: Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range. *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 84–90.
- Kleiboeker, S. B., T. G. Burrage, G. A. Scoles, D. Fish, and D. L. Rock, 1998: African swine fever virus infection in the argasid host, *Ornithodoros porcinus porcinus*. *J. Virol.* **72**, 1711–1724.
- Kleiboeker, S. B., G. A. Scoles, T. G. Burrage, and J. Sur, 1999: African swine fever virus replication in the midgut epithelium is required for infection of *Ornithodoros* ticks. *J. Virol.* **73**, 8587–8598.
- Lacey, L. A., and J. R. Adams, 1994: An iridescent virus from *Popillia japonica* (Col. Scarabaeidae). *Entomophaga* **39**, 131–136.
- Langdon, J. S., and J. D. Humphrey, 1987: Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *J. Fish Dis.* **10**, 289–297.

- Langdon, J. S., J. D. Humphrey, L. M. Williams, A. D. Hyatt, and H. A. Westbury, 1986: First virus isolation from Australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis*, L. *J. Fish Dis.* **9**, 263–268.
- Mao, J., R. P. Hedrick, and V. G. Chinchar, 1997: Molecular characterization, sequence analysis and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology* **229**, 212–220.
- Mao, J., J. Wang, G. D. Chinchar, and V. G. Chinchar, 1999: Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Dis. Aquat. Org.* **37**, 107–114.
- Marschang, R. E., P. Becher, H. Posthaus, P. Wild, H.-J. Thiel, U. Müller-Doblies, E. F. Kaleta, and L. N. Bacciarini, 1999: Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoise (*T. hermanni*). *Arch. Virol.* **144**, 1909–1922.
- McIntosh, A. H., and M. Kimura, 1974: Replication of the insect *Chilo iridescent virus* (CIV) in a poikilothermic vertebrate cell line. *Intervirology* **4**, 257–267.
- Moore, N. F., and D. C. Kelly, 1980: A comparative study of the polypeptides of three iridescent viruses by N-terminal analysis, amino acid analysis, and surface labeling. *J. Invertebr. Pathol.* **36**, 415–422.
- Müller, M., N. Zanger, and T. Denzler, 1988: Iridovirus-epidemie bei der griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni hermanni*). In: Iffen, H., and H.-D. Schröder (eds), *Erkrankungen der Zootiere. Proceedings of the International Symposium on Zoo and Wild Animals*, pp. 721–724. Academic-Verlag, Berlin.
- Murphy, F. A., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, S. A. Ghabrial, A. W. Jarvis, G. P. Martelli, M. A. Mayo, and M. D. Summers, 1995: *Virus Taxonomy. Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 95–99. Springer, Wien.
- Ohba, M., and K. Aizawa, 1981: Lethal toxicity of arthropod iridoviruses to an amphibian *Rana limnocharis*. *Arch. Virol.* **68**, 153–156.
- Ohba, M., and K. Aizawa, 1982: Mammalian toxicity of an insect iridovirus. *Acta Virol.* **26**, 165–168.
- Plattner, H., and H. P. Zingsheim, 1987: *Elektronenmikroskopische Methodik in der Zell- und Molekularbiologie*. Gustav Fischer, Stuttgart.
- Pozet, F., M. Morand, A. Moussa, C. Torhy, and P. deKinkelin, 1992: Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.* **14**, 35–42.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis, 1989: *Molecular Cloning – a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Spurr, A. R., 1969: A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.* **26**, 31–43.
- Steinhouse, E. A., and R. Leutenegger, 1963: Icosahedral virus from a scarab (*Sericesthis*) [iridovirus]. *J. Insect Pathol.* **5**, 246–248.
- Thompson, J. D., D. J. Higgins, and T. J. Gibson, 1994: Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Tidona, C. A., P. Schnitzler, R. Kehm, and G. Darai, 1998: Is the major capsid protein of iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution? *Virus Genes* **16**, 59–66.
- Ward, V. K., and J. Kalmakoff, 1991: Invertebrate Iridoviridae. In: Kurstak, E. (ed.), *Viruses of Invertebrates*, pp. 197–226. Marcel Dekker, New York.
- Webby, R., and J. Kalmakoff, 1998: Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. *Arch. Virol.* **143**, 1949–1966.
- Whittington, R. J., and L. A. Reddacliff, 1995: Influence of environmental temperature on experimental infection of redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) with experimental infected epizootic haematopoietic necrosis virus, an Australian iridovirus. *Aust. Vet. J.* **72**, 421–424.
- Williams, T., 1996: The iridoviruses. *Adv. Virol. Res.* **46**, 345–412.
- Williams, T., V. G. Chinchar, G. Darai, A. Hyatt, J. Kalmakoff, and V. Seligy, 2000: Iridoviridae. In: Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (eds), *Virus Taxonomy: 7th Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 167–182. Academic Press, New York.
- Wolf, K., G. L. Bullock, C. E. Dunbar, and M. C. Quimby, 1968: Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Inf. Dis.* **118**, 253–262.
- Xeros, N., 1954: A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature* **174**, 562.

4. Zusammenfassende Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden die Diskussionen der vorangegangenen Kapitel 3.1 und 3.2 zusammengefasst. Hierbei wird der Versuch unternommen, vor allem Aspekte aufzugreifen, die in den Diskussionen der vorangestellten Publikationen nicht berücksichtigt werden konnten. Auf eine erneute Diskussion der methodischen Ansätze wird an dieser Stelle verzichtet und auf die ausführliche Bearbeitung dieser Problematik in den vorangegangenen Kapiteln verwiesen.

Das Invertebratenisolat GbIV

Die in Kapitel 3.1 vorgestellten Untersuchungen belegen die Isolierung eines Iridovirus aus Mittelmeergrillen (*Gryllus bimaculatus*) des freien Futtertierhandels in Bayern. Alle untersuchten morphologischen und molekularbiologischen Charakteristika des Isolates weisen auf seine nahe Verwandtschaft zu der Typspezies der Gattung *Iridovirus*, *Invertebrate iridescent virus-6* (*IIV-6*, Syn.: *Chilo iridescent virus*) hin. Ein großer Mangel der vorgestellten Untersuchungen ist dabei die Tatsache, dass ein direkter Vergleich des neuen Isolates mit den beiden offiziell anerkannten Spezies der Gattung, *IIV-1* (*Invertebrate iridescent virus-1*; Syn.: *Tipula iridescent virus*) und *IIV-6*, nicht durchgeführt werden konnte. Trotz mehrfacher Anfragen ist es dem Verfasser leider nicht gelungen, Referenzstämme der beiden Viren zur Verfügung gestellt zu bekommen. Dadurch lassen die Untersuchungen zur Charakterisierung des neuen Isolates nur einen Vergleich der Ergebnisse mit den aus der Literatur oder aus Genbanken bekannten Daten zu. Die vorgenommene systematische Eingruppierung muss deshalb, ebenso wie die Namensgebung für das Isolat, *Gryllus bimaculatus iridescent virus* (GbIV), als vorläufig angesehen werden. Dennoch machen die Ergebnisse deutlich, dass GbIV in keinem der untersuchten Merkmale so deutlich von den Charakteristika der Spezies *IIV-6* abweicht, dass GbIV als eigenständige, neue Art innerhalb der Gattung angesprochen werden kann. Insbesondere der Sequenzvergleich des major capsid proteins (MCP) auf Nukleinsäure- und Aminosäurenbasis spricht gegen die Einstufung von GbIV als neue Art. Zwar wurde mit 140 Aminosäuren nur knapp ein Drittel der gesamten MCP-Sequenz untersucht*, doch die Nutzbarkeit des sequenzierten Bereichs für

* Die Länge des MCP beträgt zwischen 459 Aminosäuren bei *Lymphocystis disease virus-1* (*LCDV-1*) und 472 Aminosäuren bei *Invertebrate iridescent virus 22* (*IIV22*; Syn: *Simulium iridescent virus*) (Tidona et al., 1998)

taxonomische Fragestellungen ist in anderen Untersuchungen ausreichend belegt worden (Webby & Kalmakoff, 1998). Mit 97.8 % Sequenzhomologie auf Nukleinsäureebene und 98.6 % Homologie auf Aminosäureebene wird die von dem ICTV für distinkte Arten geforderte Grenze von 90 % (Williams et al., 2000) weit überschritten, so dass das Isolat GbIV als Variation oder Stamm von *IIV-6* zu bewerten ist.

Die hier vorgestellte Isolierung und Charakterisierung von GbIV stellt die erste Beschreibung einer *Iridovirus*-Infektion bei Insekten in Deutschland dar. Weltweit sind bislang nur zwei weitere Berichte über *Iridovirus*-Infektionen bei orthopteroiden Insekten bekannt geworden. Boucias et al., (1987) beschrieben ein Iridovirus aus Maulwurfsgryllen (*Scapteriscus vicinus*), das zu epidemieartigen Todesfällen bei Grillenlarven im Freiland Brasiliens führte. Von diesem Isolat liegen neben morphologischen Daten auch einige Informationen über DNA-Restriktionsfragmente und virale Proteinprofile nach SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen vor. Informationen über die MCP-Sequenz fehlen bislang jedoch. Die zweite Beschreibung einer *Iridovirus*-Infektion bei orthopteroiden Insekten stammt von Kleespiess et al., (1999). Sie isolierten und charakterisierten ein Iridovirus aus kommerziell produzierten Heimchen (*Acheta domestica*) und Feldgrillen (*Gryllus campestris*) die in holländischen Futtertierzuchten Massensterben zeigten. Dieses Isolat wurde als „CrIV“ benannt und zunächst nur lückenhaft molekularbiologisch charakterisiert. Dennoch zeigten die ursprünglich veröffentlichten Daten, dass CrIV aufgrund von DNA-Restriktionsfragmentanalysen sowohl von *IIV-6*, als auch von dem Isolat aus den brasilianischen Maulwurfsgryllen (Boucias, 1987) abgegrenzt werden konnte (Kleespiess et al., 1999). Leider ist es dem Verfasser auch im Fall von CrIV nicht gelungen, das Isolat als Vergleichsvirus bei den hier vorgestellten Untersuchungen mit einbeziehen zu können. Neueste Untersuchungen über CrIV durch Jakob et al. (2002) belegen, dass die MCP-Sequenzen von CrIV und GbIV zu 100 % identisch sind. Darüber hinaus wurden erstmals neben der Gensequenz des Hauptstrukturproteins auch sechs weitere Genorte von CrIV mit den inzwischen verfügbaren entsprechenden Sequenzen (Jakob et al., 2001) von *IIV-6* verglichen. Die Homologien der untersuchten Gene und ihrer Genprodukte lagen im Mittel bei über 95 %. Obwohl ein direkter molekularbiologischer Vergleich der beiden Isolate, CrIV und GbIV, noch aussteht, weisen diese neueren Daten darauf hin, dass beide Isolate identisch sind und Variationen oder Stämme von *IIV-6* darstellen.

Die Rolle, die CrIV oder GbIV bei den immer wieder zu beobachtenden Massensterben von Insekten in Futtertierzuchten spielen, ist bis heute nur lückenhaft untersucht. Die von Kleespiess et al. (1999) beschriebenen epidemieartigen Ausfälle in holländischen Zuchten wurden zunächst allein auf die Wirkung der Infektion mit CrIV zurückgeführt. Nach bislang unveröffentlichten Untersuchungen wurden in diesen holländischen Beständen zeitgleich aber auch starke bakterielle Infektionen mit *Serratia spec.* u.a. nachgewiesen. (Prof. P. Zwart, BIBLIOZOO, Bunnik, Holland, persönliche Mitteilung). Deutsche Futtertierzüchter, die im Jahr 2001 in einigen Betrieben fast vollständige Ausfälle bei Heimchen (*Acheta domesticus*) zu beklagen hatten, gaben als ein Symptom der Erkrankung eine intensiv rote Verfärbung sterbender Tiere an. Die gleiche Symptomatik wurde von Boucias et al. (1987) bei den Massensterben der brasilianischen Maulwurfsgrillen beschrieben. Auch in diesem Fall wurde eine bakterielle Koinfektion mit *Serratia spec.* nachgewiesen. Boucias et al., kamen zu dem Schluss, dass das isolierte Iridovirus das auslösende Agens für das Massensterben der Insekten sei und das Vorkommen von *Serratia spec.* lediglich eine sich rasch ausbreitende bakterielle Sekundärinfektion in geschwächten und sterbenden Tieren wäre. Da *Iridovirus*-Infektionen häufig auch mit latenten oder klinisch inapparenten Infektionen bei Insekten einhergehen (Williams et al., 2000; López et al., 2002; Martinez et al., 2003) ist theoretisch jedoch auch der umgekehrte Fall denkbar. In kommerziellen Insektenzuchten, die häufig mehrere Zehntausend Individuen auf engstem Raum vereinigen und dadurch sehr rasch durchseucht werden können, sind neben viralen und bakteriellen Erregern häufig auch Infektionen mit Mikrosporidien zu beobachten, die ebenfalls zu massiven Verlusten führen können. Die jeweilige Bedeutung einzelner Erreger am „Phänomen“ des Massensterbens in Futtertierzuchten kann deshalb nur aufgrund von fundierten Untersuchungen beantwortet werden, die eine breite Palette von möglichen mikrobiologischen Erregern, Parasiten, abiotischen Faktoren, Haltungsbedingungen und züchterischen Aspekten wie Inzuchtfaktoren u.a. berücksichtigen. Derartige Untersuchungen stehen bislang noch aus, so dass die eigentlichen Ursachen für die massiven Verluste der Züchter noch nicht ausreichend bekannt sind.

Die Reptilienisolate - Abschließende Beurteilungen und Ausblick

In Kapitel 3.2 wurde die Charakterisierung von vier Virusisolaten, die im Staatlichen Veterinäruntersuchungsamt Detmold aus drei verschiedenen Arten von verendeten

insectivoren Reptilien gewonnen wurden beschrieben. Die Studie belegt, dass die vier Isolate in allen untersuchten morphologischen und molekularbiologischen Parametern mit dem Invertebratenisolat GbIV übereinstimmen. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Ergebnisse legen somit den Schluss nahe, dass alle fünf untersuchten *Iridovirus*-Isolate identisch sind oder zumindest Variationen eines einzigen Virus, des *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6)*, darstellen. Die mehrfache Isolierung eines *Iridovirus* aus Geweben klinisch auffälliger Reptilien, die nach unklarer Pathogenese verstarben, wirft unmittelbar die Frage auf, welche Bedeutung dieses Virus für das jeweilige Krankheitsgeschehen hatte. Diese Frage kann weder auf der Grundlage der nur unvollständig bekannten klinischen und histopathologischen Daten, noch aufgrund der hier durchgeführten Untersuchungen beantwortet werden. Wird jedoch unterstellt, dass bei der ursprünglichen Probennahme durch das Staatliche Veterinäruntersuchungsamt Detmold, eine Kontamination der beprobten, und teilweise gepoolten Reptiliengewebe mit Virus enthaltendem Darminhalt ausgeschlossen werden kann, so verbleibt zumindest der Verdacht, dass in vier voneinander unabhängigen Fällen, eine Vermehrung eines bislang nur bei Invertebraten nachgewiesenen Virus, in Wirbeltiergeweben stattgefunden hat. Daraus ergibt sich die Frage, ob diese neuen Isolate von *IIV-6* allgemein oder evtl. nur unter bestimmten Bedingungen, wie z.B. im Zuge von Koinfektionen mit anderen Erregern, Faktorenkrankheiten, suboptimalen Haltungsbedingungen, außergewöhnlichen Stressbelastungen, akuter Immunsuppression, Schädigungen der Darm-Blutschranke, u. ä., in der Lage sind, die Tierstammschranke zwischen Arthropoden und Vertebraten zu überspringen. Welche Übertragungswege kommen neben einer oralen Infektion über infizierte Futtertiere in Frage? Ist das Virus über eine mögliche reine Virusvermehrung hinaus pathogen für insectivore Vertebraten? Und wenn ja, in welcher Weise?

Alle diese weiter reichenden Fragestellungen müssen im Moment unbeantwortet bleiben und erfordern eine Reihe fundierter experimenteller Untersuchungen, die den Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sprengen würden. Die Durchsicht der Literatur ergibt, dass die grundsätzliche Frage nach einer möglichen Pathogenität von *IIV-6* für Wirbeltiere bereits mehrfach Gegenstand von Untersuchungen war. Ohba & Aizawa (1981; 1982) führten Infektionsexperimente mit *IIV-6* bei Fröschen (*Rana limnocharis*) und Labormäusen (*Mus musculus*) durch. Die intraperitoneale Injektion von hochangereicherten Viruslösungen führte in beiden Versuchstieren innerhalb von 24 bis 37 Stunden unter hämorrhagischer Peritonitis

und Ascites zum Tod. Durch UV-Licht inaktivierte Viruslösungen waren ebenfalls letal für die Versuchstiere, wohingegen durch Hitze inaktivierte Viruslösungen keinerlei Effekte zeigten. Diese Experimente führten zu dem Schluss, dass die Todesfälle auf eine toxische Proteinkomponente der Viren und nicht auf die schädigende Wirkung einer Virusreplikation zurückzuführen sei. Im Falle der Mäuse wurden neben der oben beschriebenen Peritonitis ebenfalls Hepatitiden beobachtet und die Leber wurde daraufhin als das eigentliche „Zielorgan“ für die Toxizität des Virus diskutiert (Ohba & Aizawa, 1982). Eine entsprechende toxische Wirkung auf Mäuse ist auch von *FV-3*, der Typspezies der Gattung *Ranavirus* bekannt (Kirn et al., 1972; 1989; Essbauer & Ahne, 2001). *FV-3* zeigt bei Temperaturen über 30 °C keine Virusreplikation in Zellkultur und gilt deshalb als apathogen für Wirbeltiere mit höheren Körpertemperaturen (Essbauer & Ahne, 2001). Die intraperitoneale Applikation von unbehandelten Viruslösungen, hochkonzentrierten inaktivierten Viren, oder eines Gemisches löslicher Virusproteine von *FV-3* führt bei Mäusen zu einer degenerativen Hepatitis mit Zerstörung der von Kupfferschen-Sternzellen und von Leberendothelien. Darüber hinaus wurden auch pathologische Veränderungen in der Milz, den Nieren, dem Verdauungstrakt und dem Herzen beobachtet (Kirn et al., 1989).

Es ist bislang nicht geklärt, ob die in früheren Studien beobachteten toxischen Wirkungen von Invertebraten- und Vertebraten-Iridoviren auf eine gemeinsame Proteinkomponente zurückgeführt werden können, oder aber verschiedene Ursachen haben. Abschließend bleibt zu bemerken, dass aus der Literatur bis heute keinerlei Hinweise auf eine mögliche Pathogenität von *IIV-6* für Wirbeltiere bekannt sind. Die Frage, ob die in dieser Arbeit vorgestellten, „neuen“ *IIV-6* Isolate Mutationen darstellen, die ein mögliches Erkrankungsrisiko für insectivore Reptilien innehaben, müsste letztendlich durch eine Abfolge von Experimenten im Sinne der klassischen „Kochschen Postulate“ geklärt werden, sofern man überhaupt voraussetzen kann, dass es sich um ein monokausales Infektionsgeschehen handelt. Bereits das erste Postulat aber, nachdem das mögliche krankmachende Agens in jedem Fall der auftretenden Erkrankung nachweisbar sein muss, bereitet bereits Schwierigkeiten, da bislang kein spezifisches Krankheitsbild bei Reptilien beschrieben wurde. In den vier untersuchten Fällen verstarben die Patienten mit „unspezifischen Symptomen“, die zudem bis auf die Pneumonie bei einer der beiden Bartagamen (*Pogona vitticeps*) und den pockenähnlichen Hautläsionen der Kragenechse (*Chamydosaurus kingii*) nur unzureichend dokumentiert sind. Es liegen uns beispielsweise

keine Informationen über den Allgemeinzustand der Tiere, über die Haltungsbedingungen bei den Tierbesitzern oder über mögliche weitere abiotische oder biotische pathogene Faktoren vor. Weitere klinische Fälle, die in einem möglichen Zusammenhang mit Invertebraten-Iridovirus-Infektionen stehen könnten, sind uns bisher ebenfalls nicht bekannt geworden. Eine klinische Studie über das Vorkommen von Invertebraten-Iridoviren bei insectivoren Reptilien wäre deshalb u.U. wünschenswert, erscheint aufgrund der derzeitigen Fallzahl aber noch zu wenig begründet.

Als weiteres Vorgehen muss letztendlich über einen Infektionsversuch bei insectivoren SPF-Reptilien (specific pathogen free) nachgedacht werden. Aus Gründen des Tierschutzes könnte und müsste allerdings vor der Planung und Durchführung von Tierversuchen an Wirbeltieren noch eine Reihe von in vitro Experimenten durchgeführt werden. Hierzu gehört beispielsweise die quantitative Untersuchung der Virusreplikation in Zellkultur in Abhängigkeit von der Temperatur mit Angaben über optimale und maximale Temperaturen. Für *IIV-6* wird eine Optimaltemperatur von 21 °C auf Insektenzellen und eine Maximaltemperatur von 35 °C angegeben (Cerutti & Devauchelle, 1980; Kelly & Robertson, 1973). Eine Virusvermehrung wäre aufgrund dieses Temperaturbereichs zumindest bei poikilothermen Vertebraten, etwa bei suboptimalen Haltungsbedingungen, nicht völlig auszuschließen. Ein Anzuchtversuch der Isolate auf einem breiten Spektrum von Wirbeltierzelllinien könnte weitere Hinweise auf die mögliche Empfänglichkeit verschiedener Wirbeltierspezies gegenüber *IIV-6* geben. Vorläufige, bislang unveröffentlichte Ergebnisse aus eigenen Studien belegen, dass sich sowohl GbIV, als auch das Isolat „1998“ aus der Bartagame (*Pogona vitticeps*), auf verschiedenen Wirbeltierzelllinien, wie den Fischzelllinien BF-2 (bluegill fry cells-2, Sonnenbarsch, *Lepomis macrochirus*), EPC (epithelioma papulosum cyprini, Karpfen, *Cyprino carpio*) und CLC (carp leucocyte culture, Karpfen, *Cyprino carpio*) bei 20°C, sowie auf der Reptilienzelllinie VH-2 (viper heart cells-2, Kettenviper, *Vipera russeli*) bei 29°C vermehren lassen. Untersuchungen dieser Art könnten auf weitere Reptilienzelllinien und auf Zelllinien von Warmblütern (Vögel und Säuger) ausgeweitet werden. Darüber hinaus sind Studien mit embryonierten Hühnereiern und - in einem weiteren Schritt – mit embryonierten Eiern insectivorer Reptilien denkbar. Bei allen diesen Untersuchungen wären parallele Ansätze mit dem Referenzstamm von *IIV-6* wünschenswert, um zu klären, ob sich die „neuen Isolate“ in ihrem Replikationsverhalten in

vitro oder in vivo von der bekannten Spezies unterscheiden und eventuell auf Wirbeltiere adaptierte Mutationen des Originalstammes darstellen.

Alle diese und eine Vielzahl weiterer, hier nicht angedachter offener Fragestellungen zeigen, dass das Gebiet der bislang vergleichsweise wenig untersuchten *Iridoviridae* auch in der Zukunft ein lohnendes Betätigungsfeld für virologische Grundlagenforscher, Ökologen und Kliniker sein könnte.

5. Zusammenfassung: Isolierung und Charakterisierung von Iridoviren

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Isolierung und Charakterisierung eines Invertebraten-Iridovirus aus kommerziell in Deutschland gezüchteten Mittelmeergrillen (*Gryllus bimaculatus*) mit auffällig hoher Sterblichkeit. Transmissions-elektronenmikroskopische Untersuchungen belegen das Assembly von icosaedrischen Viruspartikeln in Form parakristalliner Strukturen innerhalb des Zytoplasmas hypertrophierter Fettkörperzellen adulter Grillen. Das infektiöse Agens konnte auf der Schmetterlings-Zelllinie sf-9 kultiviert werden. Innerhalb von 8 Tagen post infectionem zeigten sich zytopathische Effekte in Form von Zellhypertrophie, Vakuolisierung und Zelltod. Negativ kontrastierte Viruspartikel ($n = 100$) zeigten Dimensionen von 172 ± 6 nm (Spitze zu Spitze) und 148 ± 5 nm (Seite zu Seite). Mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese konnten mehr als 20 verschiedene Polypeptide und eine quantitativ überwiegende Hauptbande mit einem Molekulargewicht von 50 kDa unterschieden werden. Restriktionsfragment-Längenprofile nach enzymatischem Verdau viraler DNA mit den Endonukleasen *EcoRI*, *BamHI* und *HindIII* zeigten signifikante Unterschiede zu den entsprechenden Profilen von Iridoviren niederer Vertebraten (Gattung: *Ranavirus*) wie *Rana esculenta* Iridovirus oder *Frog virus 3*. Ein enzymatischer Verdau mit den Endonukleasen *MspI* und *HpaII* zeigte, dass die virale DNA unmethyliert war. Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) konnte ein 420 bp langes DNA-Fragment amplifiziert werden, das 97 % Sequenzhomologie zu dem Gen des Hauptstrukturproteins (major capsid protein, MCP) von *Invertebrate iridescent virus 6 (IIV-6)* aufwies. Die Daten weisen darauf hin, dass dieses neue Isolat dem Genus *Iridovirus* aus der Familie *Iridoviridae* zuzuordnen ist. Das Isolat stellt das erste in Deutschland nachgewiesene Invertebraten-Iridovirus dar. Zur vorläufigen Benennung wird der Name *Gryllus bimaculatus iridescent virus (GbIV)* vorgeschlagen.

Die Untersuchung von vier weiteren Iridoviren, die in den Jahren 1998, 1999 und 2000 aus den Geweben von verstorbenen Reptilien der Arten *Pogona vitticeps*, *Chamaeleo quadricornis* und *Chamydosaurus kingii* isoliert wurden, ergab zytoplasmatische DNA-Viren mit im Vergleich zu GbIV identischen morphologischen und molekularbiologischen Eigenschaften. Aus den Daten wird gefolgert, dass alle fünf untersuchten, deutschen Iridovirusisolate identisch sind und Variationen oder Stämme der Typspezies der Gattung *Iridovirus*, *IIV-6*, repräsentieren. Es besteht der Verdacht, dass das Invertebraten-Iridovirus GbIV in der Lage ist, sich in Reptilien zu vermehren.

6. Summary: Isolation and Characterization of Iridoviruses

We describe the isolation and characterization of an iridescent virus from commercially produced colonies of *Gryllus bimaculatus* in Germany, which showed apparent mortality. Transmission electron microscopy studies on adult cricket specimens revealed the paracrystalline assembly of icosahedral virus particles in the cytoplasm of hypertrophied abdominal fat body cells. The infecting agent could be cultivated in the lepidopteran cell line sf-9, where it caused cytopathogenic effects such as cell hypertrophy, cytoplasmic vacuolization, and cell death within 8 days postinfection. Negatively stained virus particles ($n = 100$) had dimensions of 172 ± 6 nm (apex to apex) and 148 ± 5 nm (side to side). SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of virus proteins showed more than 20 distinct polypeptides with a major species of approximately 50 kDa. Analysis of the restriction fragment length profiles from digestion of purified viral DNA with the endonucleases *EcoRI*, *BamHI*, and *HindIII* showed marked differences from the profiles of iridoviruses of lower vertebrates (genus *Ranavirus*), e.g., *Rana esculenta* Iridovirus and *Frog virus 3*. Restriction enzyme digests with the endonucleases *MspI* and *HpaII* indicated the lack of methylation of viral DNA. Polymerase chain reaction led to the amplification of a 420-bp gene fragment with 97 % sequence homology to the major capsid protein gene of *Invertebrate iridescent virus 6* (*IIV-6*). The data indicate, that this new isolate, which is the first iridescent virus reported from Germany, belongs to the genus *Iridovirus* of the family *Iridoviridae*. It is proposed to be termed *Gryllus bimaculatus* iridescent virus (GbIV).

The investigation of four other iridescent-like viruses which were obtained in 1998, 1999 and 2000 from various tissues of three reptile species, e.g. *Pogona vitticeps*, *Chamaeleo quadricornis*, and *Chamydosaurus kingii*, revealed cytoplasmic desoxyriboviruses with the exact morphological and molecular biological characteristics of the formerly described GbIV. We conclude that all five isolates of iridescent-like viruses from Germany are identical and represent variants or strains of the type species of the genus *Iridovirus*, *IIV-6*. The data indicate, that GbIV, an invertebrate iridescent virus, is able to replicate in reptiles.

7. Literaturverzeichnis

- AHNE, W., BREMONT, M., HEDRICK, R. P., HYATT, A. D., UND WHITTINGTON, R. J. (1997). Special topic review: iridoviruses associated with EHN in aquaculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 367-373.
- ANDERSON, J. F. (1970). An iridescent virus infecting the mosquito *Aedes stimulans*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**, 219-224.
- BAHR, U., TIDONA, C. A., UND DARAI, G. (1997). The DNA sequence of Chilo iridescent virus between the genome coordinates 0.101 and 0.391; similarities in coding strategy between insect and vertebrate iridoviruses. *Virus Genes* **15**, 235-245.
- BAILEY, L., BALL, B. V., UND WOODS, R. D. (1976). An iridovirus from bees. *J. Gen. Virol.* **31**, 459-461.
- BARTHE, D., RONDELAUD, D., FAUCHER, Y., UND VAGO, C. (1984). Infection virale chez les mollusque pulmone *Lymnaea truncatula* Muller. *Comptes Rendus d l'Académie des Sciences (Paris)* **298**, Ser.3, 513-515.
- BATSON, B. S., UND JOHNSTON, M. R. L. (1976). An iridescent virus from *Simulium* sp. (Diptera: Simuliidae) in Wales. *J. Invertebr. Pathol.* **27**, 133-135.
- BOLLINGER, T. K., MAO, J., SCHOCK, D., BRIGHAM, R. M., UND CHINCHAR, V. R. (1999). Pathology, isolation and preliminary molecular characterization of a novel iridovirus from tiger salamanders in Saskatchewan. *J. Wildl. Dis.* **35**, 413-429.
- BOUCIAS, D. G., MARUNIAK, J. E., UND PENDLAND, J. C. (1987). Characterization of an iridovirus isolated from the southern mole cricket, *Scapteriscus vicinus*. *J. Invertebr. Pathol.* **50**, 238-245.
- CAMAZINE, S., UND LIU, T. P. (1998). A putative iridovirus from the honey bee mite *Varroa jacobsoni* Oudemans. *J. Invertebr. Pathol.* **71**, 177-178.
- CAME, P. E., GEERING, G., OLD, L. J., UND BOYSE, E.A. (1968). A serological study of polyhedral cytoplasmic viruses isolated from amphibia. *Virol.* **36**, 392-400.
- CAREY, G. P., LESCOTT, T., ROBERTSON, J. S., SPENCER, L. K., UND KELLY, D. C. (1978). Three african isolates of small iridescent viruses: type 21 from *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae), type 23 from *Heteronychus arator* (Coleoptera: Scarabaeidae), and type 28 from *Lethocerus columbiae* (Hemiptera, Heteroptera: Belostomatidae). *Virology* **85**, 307-309.
- CERUTTI, M., UND DEVAUCHELLE, G. (1980). Inhibition of macromolecular synthesis in cells infected with an invertebrate virus (Iridovirus Type 6 or CIV). *Arch. Virol.* **63**, 297-303.

- CHAPMAN, H. C., PETERSEN, J. J., WOODWARD, D. W., UND CLARK, T.B. (1968). *Mosq. News* **28**, 122-123.
- CHAPMAN, H. C., CLARK, T. B., ANTHONY, D. W., UND GLENN, F. E. Jr. (1971). An iridescent virus from larvae of *Corethrella brakeleyi* (Diptera: Chaoboridae) in Louisiana. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 284-286.
- CHINCHAR, V. G., ESSBAUER, S., HE, J. G., HYATT, A., MIYAZAKI, T., SELIGY, V., UND WILLIAMS, T. (in Vorb.). Iridoviridae. In: Virus Taxonomy: 8th report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, New York.
- CLARK, T. B., KELLEN, W. R. UND LUM, P. T. M. (1965). A mosquito iridescent virus (MIV) from *Aedes taeniorhynchus* (Wiedemann). *J. Invertebr. Pathol.* **7**, 519-521.
- COMPS, M, UND BONAMI, J. R. (1977). Infection virale associée à des mortalités chez l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **285**, Ser.D, 1139-1140.
- CULLEN, B. R., OWENS, L., UND WHITTINGTON, R. J. (1995). Experimental infection of australian anurans (*Limnodynaster terrareginae* and *Litoria latopalmata*) with Bohle iridovirus. *Dis. Aquat. Org.* **23**, 83-92
- DARLINGTON, R. W., GRANOFF, A., UND BREEZE, D. C. (1966). Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. II. Ultrastructural studies and sequential development of virus isolated from normal and tumor tissue. *Viol.* **29**, 149-156.
- D' COSTA, S. M., YAO, H., UND BILIMORIA, S. L. (2001). Transcription and temporal cascade in Chilo iridescent virus infected cells. *Arch. Virol.* **146**, 2165-2178.
- DELIUS, H., DARAI, G., UND FLÜGEL, R. M. (1984). DNA analysis of *Insect Iridescent Virus 6*: evidence for circular permutation and terminal redundancy. *J. Virol.* **49**, 609-614.
- DEVAUCHELLE, G. (1977). Ultrastructural characterization of an iridovirus from the marine worm *Nereis diversicolor* (O. F. Müller). *Virology* **81**, 237-246.
- DEVAUCHELLE, G., ATTIAS, J., MONNIER, C., BARRAY, S., CERUTTI, M., GUERILLON, J., UND ORANGE-BALANGE, N. (1985). Chilo iridescent virus. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **116**, 37-48.
- ELLIOTT, R. M., LESCOTT, T., UND KELLY, D. C. (1977). Serological relationships of an iridescent virus (type 25) recently isolated from *Tipula sp.* with two other iridescent viruses (type 2 and 22). *Virology* **81**, 309-316.
- ESSANI, K., UND GRANOFF, A. (1989a). Amphibian and piscine iridoviruses proposal for nomenclature and taxonomy based on molecular and biological properties. *Interviol.* **30**, 187-193.
- ESSANI, K., UND GRANOFF, A. (1989b). Properties of amphibian and piscine iridoviruses: a comparison. In AHNE, W., UND KURSTAK, E. (Eds.). Viruses of lower vertebrates. Springer Verlag Berlin, pp. 79-85.

- ESSBAUER, S., UND AHNE, W. (2001). Viruses of lower vertebrates. *J. Vet. Med. B* **48**, 403-475.
- FEDERICI, B. A. (1980). Isolation of an iridovirus from the terrestrial isopods, the pillbug, *Armadillidium vulgare*, and the sow bug, *Porcellio dilatatus*. *J. Invertebr. Pathol.* **36**, 373-381.
- FEDERICI, B. A., UND HAZARD, E. I. (1975). Iridovirus and cytoplasmic polyhedrosis virus in the freshwater daphnid *Simocephalus expinosus*. *Nature* **254**, 327-328.
- FOWLER, M., UND ROBERTSON, J. S. (1972). Iridescent virus infection in field populations of *Wiseana cervinata* (Lepidoptera: Hepialidae) and *Witlesia sp.* (Lepidoptera: Pyralidae) in New Zealand. *J. Invertebr. Pathol.* **194**, 154-155.
- FOWLER, H. G. (1989). An epizootic iridovirus of Orthoptera (Gryllotalpidae: *Scaptericus borellii*) and its pathogenicity to termites (Isoptera: Cryptoterme). *Revista de Microbiologia* **20**, 115-120.
- FUKAYA, M. UND NASU, S. (1966). A chilo iridescent virus (CIV) from the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Ent. Zool.* **1**, 69-72.
- FUNK, C. J., HUNTER, W. B., UND ACHOR, D. S. (2000). Replication of insect iridescent virus 6 in a whitefly cell line. *J. Invertebr. Pathol.* **77**, 144-146.
- GOORHA, R. (1982). FV-3 DNA replication occurs in two stages. *J. Virol.* **43**, 519-528.
- GOORHA, R., UND MURTI, K. G. (1982). The genome of frog virus 3, an animal DNA virus, is circularly permuted and terminally redundant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 248-252.
- GRANOFF, A. (1989). Viruses of Amphibia: an historical perspective. In: AHNE, W., UND KURSTAK, E. (Eds.). Viruses of lower vertebrates. Springer Verlag, Berlin, pp. 3-12.
- GRANOFF, A., CAME, P. E., UND RAFFERTY, K. A. (1965). The isolation and properties of viruses from *Rana pipiens*: their possible relationship to the renal adenocarcinoma of the leopard frog. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **126**, 237-255.
- GRAVELL, M., UND GRANOFF, A. (1970). Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. IX. The influence of temperature and host cell on replication of frog polyhedral cytoplasmic deoxyriboviruses (PCDV). *Virol.* **41**, 596-602.
- HASAN, S., CROIZIER, G. VAGO, C., UND DUTHOIT, J. L. (1970). Infection a virus irisant dans une population naturelle d'*Aedes detritus* Haliday en France. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **2**, 295-301.
- HEDRICK, R. P., UND McDOWELL, T. S. (1995). Properties of Iridoviruses from ornamental fish. *Vet. Res.* **26**, 423-427.

- HERNÁNDEZ, O., MALDONADO, G., UND WILLIAMS, T. (2000). An epizootic of patent iridescent virus disease in multiple species of blackflies in Chiapas, Mexico. *Medical and Veterinary Entomology* **14**, 458-462.
- HESS, R. T., UND POINAR, G. O. Jr. (1985). Iridoviruses infecting terrestrial isopods and nematodes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **116**, 49-76.
- HUKUHARA, T. (1964). Induction of epidermal tumor in *Bombyx mori* (Linnaeus) with Tipula iridescent virus. *J. Insect Pathol.* **6**, 246-248
- JAKOB, N. J., MÜLLER, K., BAHR, U., UND DARAI, G. (2001). Analysis of the first complete DNA sequence of an invertebrate iridovirus: coding strategy of the genome of *Chilo Iridescent Virus*. *Virology* **286**, 182-196.
- JAKOB, N. J., KLEESPIES, R. G., TIDONA, C. A., MÜLLER, K., GELDERBLUM, H. R., UND DARAI, G. (2002). Comparative analysis of the genome and host range characteristics of two insect iridoviruses: Chilo iridescent virus and a cricket iridovirus isolate. *J. Gen. Virol.* **83**, 463-470.
- JANCOVICH, J., K., DAVIDSON, E. W., MORADO, J. F., JACOBS, B. L., UND COLLINS, J. P. (1997). Isolation of a lethal virus from the endangered tiger salamander *Ambystoma tigrinum stebbinsi*. *Dis. Aquat. Org.* **31**, 161-167.
- JUST, F. T., UND ESSBAUER, S. S. (2001). Characterization of an iridescent virus isolated from *Gryllus bimaculatus*. *J. Invertebr. Pathol.* **77**, 51-61.
- JUST, F., ESSBAUER, S. S., AHNE, W., UND BLAHAK, S. (2001). Occurrence of an invertebrate iridescent-like virus (*Iridoviridae*) in reptiles. *J. Vet. Med. B* **48**, 685-694.
- KALMAKOFF, J. (1972). An iridescent virus from the grass grub *Costelytra zealandica*: serological study. *J. Invertebr. Pathol.* **20**, 70-76.
- KELLY, D. C. (1985). Insect iridescent viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **116**, 23-35.
- KELLY, D. C., UND AVERY, R. J. (1974). The DNA content of four small iridescent viruses: genome size redundancy and homology determined by renaturation kinetics. *Virology* **57**, 425-435.
- KELLY, D. C., UND ROBERTSON, J. C. (1973). Icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. Gen. Virol.* **20**, 17-41.
- KELLY, D. C., UND VANCE, D. F. (1973). The lipid content of two iridescent viruses. *J. Gen. Virol.* **21**, 417-423.
- KELLY, D. C., AYRES, M. D., LESCOTT, T., ROBERTSON, J. S., UND HAPP, G. M. (1979). A small iridescent virus (type 29) isolated from *Tenebrio molitor*: a comparison of its proteins and antigens with six other iridescent viruses. *J. Gen. Virol.* **42**, 95-105.

- KINARD, G. R., BARNETT, O. W., UND CARNER, G. R. (1995). Characterization of an iridescent virus isolated from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatilis*. *J. Invertebr. Pathol.* **66**, 258-263.
- KIRN, A., GUT, J.-P., BINGEN, A., UND HIRTH, C. (1972). Acute hepatitis produced by frog virus 3 in mice. *Arch. Ges. Virusforsch.* **36**, 394-397.
- KIRN, A., GENDRAULT, J. L., STEFFAN, A. M., GUT, J. P., UND BINGEN, A. (1989). Murine hepatitis induced by FV-3. In: AHNE, W., UND KURSTAK, E. (Hrsg.). Viruses of lower vertebrates, pp. 60-68. Springer Verlag, Heidelberg.
- KLEESPIES, R. G., TIDONA, C. A., UND DARAI, G. (1999). Characterization of a new iridovirus isolated from crickets and investigations on the host range. *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 84-90.
- LACEY, L. A., UND ADAMS, J. R. (1994). An iridescent virus from *Popillia japonica* (Col.: Scarabaeidae). *Entomophaga* **39**, 131-136.
- LANGDON, J. S. (1989). Experimental transmission and pathogenicity of epizootic haematopoietic necrosis virus (EHNV) in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., and 11 other teleosts. *J. Fish Dis.* **12**, 295-310.
- LANGDON, J. S., UND HUMPHREY, J. D. (1987). Epizootic haematopoietic necrosis, a new viral disease in redfin perch, *Perca fluviatilis* L., in Australia. *J. Fish Dis.* **10**, 289-297.
- LANGDON, J. S., HUMPHREY, J. D., WILLIAMS, L. M., HYATT, A. D., UND WETSBURY, H. A. (1986). First virus isolation from australian fish: an iridovirus-like pathogen from redfin perch, *Perca fluviatilis* L. *J. Fish Dis.* **9**, 263-268.
- LIGHTNER, D. V., UND REDMAN, R. M. (1993). A putative Iridovirus from the penaeid shrimp *Protrachypene precipua* Burkenroad (Crustacea: Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.* **62**, 107-109.
- LINLEY, J. R., UND NIELSEN, H. T. (1968a). Transmission of a mosquito iridescent virus in *Aedes taeniorhynchus*. I. Laboratory experiments. *J. Invertebr. Pathol.* **12**, 7-16.
- LINLEY, J. R., UND NIELSEN, H. T. (1968b). Transmission of a mosquito iridescent virus in *Aedes taeniorhynchus*. II. Experiments related to transmission in nature. *J. Invertebr. Pathol.* **12**, 17-24.
- LÓPEZ, M., ROJAS, J. C., VANDAME, R., UND WILLIAMS, T. (2002). Parasitoid-mediated transmission of an iridescent virus. *J. Invertebr. Pathol.* **80**, 160-170.
- LUNGER, P. D., DARLINGTON, R. W., UND GRANOFF, A. (1965). Cell-virus relationship in the Lucké renal adenocarcinoma: an ultrastructure study. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **186**, 289.
- LURIA, S. E., DARNELL, J. E. Jr., BALTIMORE, D., UND CAMPBELL, A. (1978). General Virology. 3rd.ed., John Wiley & Sons, New York, pp. 197 ff.

- MAO, J., THAM, T. N., GENTRY, G. A., AUBERTIN, A., UND CHINCHAR, V. G. (1996). Cloning, sequence analysis, and expression of the major capsid protein of Frog Virus 3. *Virology* **216**, 431-436.
- MAO, J., HEDRICK, R. P., UND CHINCHAR, V. G. (1997). Molecular characterization, sequence analysis, and taxonomic position of newly isolated fish iridoviruses. *Virology* **229**, 212-220.
- MAO, J., WANG, J., CHINCHAR, G. D., UND CHINCHAR, V. G. (1999). Molecular characterization of a ranavirus isolated from largemouth bass *Micropterus salmoides*. *Dis. Aquat. Org.* **37**, 107-114.
- MARSCHANG, R. E., BECHER, P., POSTHAUS, H., WILD, P., THIEL, H.-J., MÜLLER_DOBLIS, U., KALETA, E. F., UND BACCIARINI, L. N. (1999). Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoise (*T. hermanni*). *Arch. Virol.* **144**, 1909-1922.
- MARTINEZ, G., CHRISTIAN, P., MARINA, C., UND WILLIAMS, T. (2003). Sensitivity of *Invertebrate iridescent virus 6* to organic solvents, detergents, enzymes and temperature treatment. *Virus Res.* **91**, 249-254.
- McINTOSH, A., H., UND KIMURA, M. (1974). Replication of the insect Chilo iridescent virus (CIV) in a poikilothermic vertebrate cell line. *Intervirology* **4**, 257-267.
- MONNIER, C., UND DEVAUCHELLE, G. (1976). Enzyme activities associated with an invertebrate iridovirus: nucleotide phosphohydrolase activity associated with *iridescent virus type 6* (CIV). *J. Virol.* **19**, 180-186.
- MONTANIE, H., BONAMI, J.-R., UND COMPS, M. (1993). Irido-like virus infection in the crab *Macropipus depurator* L. (Crustacea, Decapoda). *J. Invertebr. Pathol.* **61**, 320-322.
- MOODY, N. J. G., UND OWENS, L. (1994). Experimental demonstration of the pathogenicity of a frog virus, BIV for a fish species, barramundi *Lates calcarifer*. *Dis. Aquat. Org.* **18**, 95-102.
- MÜLLER, M., ZANGER, N., UND DENZLER, T. (1988). Iridovirusepidemie bei der griechischen Landschildkröte (*Testudo hermanni hermanni*). In IFFEN, H., UND SCHRÖDER, H.-D. (Hrsg.). Erkrankungen der Zootiere. *Proc. Int. Symp. Zoo and Wild Animals*, Berlin, pp. 721-24.
- MULLENS, B. A., VELTEN, R. K., UND FEDERICI, B. A. (1999). Iridescent virus infection in *Culicoides variipennis sonorensis* and interactions with the mermithid parasite *Heleidomermis magnapapula*. *J. Invertebr. Pathol.* **73**, 231-233.
- MUTSCHMANN, F. (1998). Krankheiten der Amphibien. Paul Parey Verlag, Berlin.
- OHBA, M., UND AIZAWA, K. (1979). Multiplication of Chilo iridescent virus in noninsect arthropods. *J. Invertebr. Pathol.* **33**, 278-283.

- OHBA, M., UND AIZAWA, K. (1981). Lethal toxicity of arthropod iridoviruses to an Amphibian, *Rana limnocharis*. *Arch. Virol.* **68**, 153-156.
- OHBA, M., UND AIZAWA, K. (1982). Mammalian toxicity of an insect iridovirus. *Acta virol.* **26**, 165-168.
- PLUMB, J. A., GRIZZLE, M., YOUNG, H. E., NOYES, A. D., UND LAMPRECHT, S. (1996). An iridovirus isolated from wild largemouth bass. *J. Aquat. Anim. Health* **8**, 265-270.
- PLUMB, J. A., NOYES, A. D., GRAZIANO, S., WANG, J., MAO, J., UND CHINCHAR, V. G. (1999). Isolation and identification of viruses from adult largemouth bass during 1997-1998 survey in the Southeastern USA. *J. Aquat. Anim. Health* **11**, 391-399.
- POINAR, G. O. Jr., HESS, R. T., UND COLE, A. (1980). Replication of an iridovirus in a nematode (Mermithidae). *Intervirology* **14**, 316-320.
- POZET, F., MORAND, M., MOUSSA, A., TORHY, C., UND de KINKELIN, P. (1992). Isolation and preliminary characterization of a pathogenic icosahedral deoxyribovirus from the catfish (*Ictalurus melas*). *Dis. Aquat. Org.* **14**, 35-42.
- PRINGLE, C. R. (1999). Virus taxonomy – 1999. *Arch. Virol.* **144**, 421-429.
- ROLLE, M., UND MAYR, A. (2002). Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre. 7.Aufl., Enke-Verlag, Stuttgart.
- SPEARE, R., UND SMITH, J. R. (1992). An iridovirus-like agent isolated from the ornate burrowing frog *Limnodynaster ornatus* in northern Australia. *Dis. Aquat. Org.* **14**, 51-57.
- STEINHAUS, E. A. UND LEUTENEGGER, R. (1963). Icosahedral virus from the scarab (*Sericesthis*). *J. Invertebr. Pathol.* **5**, 266-270.
- STOLTZ, D. B. (1971). The structure of icosahedral cytoplasmic deoxyriboviruses. *J. Ultrastruct. Res.* **37**, 219-239.
- TIDONA, C. A., UND DARAI, G. (1997). The complete DNA sequence of LCDV. *Virology* **230**, 207-216.
- TIDONA, C. A., SCHNITZLER, P., KEHM, R., UND DARAI, G. (1998). Is the major capsid protein of Iridoviruses a suitable target for the study of viral evolution ? *Virus Genes* **16**, 59-66.
- TINSLEY, T. W., UND KELLY, D. C. (1970). An interim nomenclature system for the iridescent group of insect viruses. *J. Invertebr. Pathol.* **16**, 470-472.
- TINSLEY, T. W., ROBERTSON, J. S., RIVERS, C. F., UND SERVICE, M. W. (1971). An iridescent virus of *Aedes cantans* in Great Britain. *J. Invertebr. Pathol.* **18**, 427-428.
- TONKA, T. UND WEISER, J. (2000). Iridovirus infection in mayfly larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **76**, 229-231.

- TWEEDELL, K. S., UND GRANOFF, A. (1968). Viruses and renal carcinoma of *Rana pipiens*. V. Effect of FV-3 on developing frog embryos and larvae. *J. Nat. Cancer Inst.* **40**, 407-410.
- VAGO, C., RIOUX, J. A., DUTHOIT, J. C., UND DEDET, J. P. (1969). Infection spontanée a virus irisant dans une population d'*Aedes detritus* (Hal 1833) des environs de Tunis. *Ann. Parasit. Humaine Comp.* **44**, 667-671.
- WAGNER, H., SIMON, D., WERNER, E., GELDERBLUM, H., DARAI, G. UND FLÜGEL, R. M. (1985). Methylation pattern of DNA of FLDV. *J. Virol.* **53**, 1005-1007.
- WEBBY, R., UND KALMAKOFF, J. (1998). Sequence comparison of the major capsid protein gene from 18 diverse iridoviruses. *Arch. Virol.* **143**, 1949-1966.
- WEISER, J. (1965). A new virus of mosquito larvae. *Bull. WHO* **33**, 586-588.
- WEISER, J. (1968). Iridescent virus from the blackfly *Simulium ornatum* Meigen in Czechoslovakia. *J. Invertebr. Pathol.* **12**, 36-39.
- WESTHOUSE, R. A., JACOBSON, E. R., HARRIS, R. K., WINTER, K. R., UND HOMER, B. L. (1996). Respiratory and pharyngo-esophageal infection in a gopher tortoise (*Gopherus polyphenus*). *J. Wildl. Dis.* **32**, 682-686.
- WHITTINGTON, R. J., UND REDDA CLIFF, L. A. (1995). Influence of environmental temperature on experimental infection of redbfin perch, *Perca fluviatilis* L., and rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) with experimental infected epizootic haematopoietic necrosis virus, an australian iridovirus. *Aust. Vet. J.* **72**, 421-424.
- WILLIAMS, R. C., UND SMITH, K. M. (1957). A crystallizable insect virus. *Nature* **179**, 119-120.
- WILLIAMS, T. (1996). The iridoviruses. *Advances in Virus Res.* **46**, 345-412.
- WILLIAMS, T., UND CORY, J. S. (1994). Proposals for a new classification of iridescent viruses. *J. Gen. Virol.* **75**, 1291-1301.
- WILLIAMS, T., CHINCHAR, V. G., DARAI, G., HYATT, A., KALMAKOFF, J., UND SELIGY, V. (2000). Iridoviridae. In: vanRegenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstens, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R., and Wickner, R. B. (eds.), *Virus Taxonomy: 7th report of the international committee on taxonomy of viruses*, pp. 167-182. Academic Press, New York.
- WILLIS, D., UND GRANOFF, A. (1980). FV-3 DNA is heavily methylated at CpG sequences. *Virology* **107**, 250-257.
- WOLF, K., BULLOCK, G. L., DUNBAR, C. E., UND QUIMBY, M. C. (1968). Tadpole edema virus: a viscerotropic pathogen for anuran amphibians. *J. Infect. Dis.* **118**, 253-262.

XEROS, N. (1954). A second virus disease of the leatherjacket, *Tipula paludosa*. *Nature* **174**, 562-565.

XEROS, N. (1964a). Phagocytosis of virus in *Tipula paludosa* Meigen *J. Insect Pathol.* **6**, 225-236.

XEROS, N. (1964b). Development of the *Tipula* iridescent virus (TIV). *J. Insect Pathol.* **6**, 261-283.

Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil. R. Hoffmann, Vorstand des Instituts für Zoologie, Fischereibiologie und Fischkrankheiten der Tierärztlichen Fakultät, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. rer. nat., Dr. med. vet. habil. W. Ahne danke ich für die Vergabe des Themas, die engagierte Betreuung, seine ständige Diskussionsbereitschaft und den geduldigen Umgang mit seinem nicht immer einfachen Mitarbeiter.

Unserer kleinen Laborgemeinschaft, bestehend aus Herrn Prof. Ahne, Frau Sandra Essbauer und Frau Julia Franke danke ich für das freundschaftliche Verhältnis, den unerschütterlichen Teamgeist, die vielen anregenden Gespräche, Diskussionen und – nicht zuletzt – für die gefeierten Feste. Ihr ward die Quelle meiner Motivation.

Frau Sandra Essbauer danke ich speziell für die Anleitung meiner ersten molekularbiologischen und virologischen Schritte im Labor, sowie für die kritische Durchsicht und Diskussion der Manuskripte.

Frau Christine Vogt danke ich für die technische Unterstützung am ZEISS EM 109.

Mein wärmster Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die die harten Zeiten von Studium und Promotion nicht zum ersten Mal mit mir beschritten haben und die viel zu oft auf mich verzichten mußten.

Euch allen sei diese Arbeit gewidmet