

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

**Detektion und Differenzierung von Hämogregarinen im Blut von Importreptilien mit
Hilfe molekularbiologischer Methoden (Polymerase-Kettenreaktion und
Sequenzierung)**

von Eva Katharina Strütt

aus Lörrach

München 2015

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für aviäre Medizin und Chirurgie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. Rüdiger Korbelt

Mitbetreuung durch Priv.- Doz. Dr. Monika Rinder

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Marlon R. Schneider

Tag der Promotion: 18. Juli 2015

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Hämogregarinen	3
1.1.	Allgemeines	3
1.2.	Taxonomie.....	3
1.3.	Entwicklungszyklus.....	5
1.3.1.	Karyolysidae.....	6
1.3.1.1.	Karyolysus lacertae.....	6
1.3.1.2.	Hemolivia stellata	7
1.3.2.	Hepatozoidae	8
1.3.2.1.	Hepatozoon domerguei.....	8
1.3.2.2.	Hepatozoon sipedon.....	11
1.3.3.	Haemogregarinidae	12
1.3.2.1.	Haemogregarina balli.....	12
1.4.	Morphologie der intraerythrozytären Formen	14
1.5.	Folgen des Befalls mit Hämogregarinen	17
2.	Reptilien.....	19
2.1.	Allgemeines	19
2.2.	Taxonomie.....	20
2.2.1.	Testudines.....	20
2.2.1.1.	Klappbrust- Pelomedusenschildkröte (<i>Pelusios castaneus</i>).....	21
2.2.2.	Squamata	22
2.2.2.1.	Königspython (<i>Python regius</i>).....	22
2.2.2.2.	Grüner Hundskopfschlinger (<i>Corallus caninus</i>).....	25
2.2.2.3.	Tokeh (<i>Gekko gecko</i>).....	26
3.	Genotypische Differenzierung von Hämogregarinen	27
3.1.	PCR: Allgemeines und geschichtlicher Hintergrund	27
3.2.	Prinzip	27
3.3.	Anwendung der PCR bei Hämogregarinen	28
III.	MATERIAL UND METHODEN	32
1.	Untersuchte Tiere	32
1.1.	klinische Allgemeinuntersuchung.....	33

1.2.	Blutentnahme	35
2.	Bearbeitung der Blutproben	35
2.1.	Färbung der Blutausstriche	35
2.2.	mikroskopische Auswertung	35
2.3.	DNA-Extraktion	36
2.4.	PCR	37
2.4.1.	Primer	37
2.4.2.	Durchführung	37
2.5.	Gelelektrophorese	39
2.6.	Sequenzierung	40
2.7.	Sequenzanalysen	41
IV.	ERGEBNISSE	43
1.	Klinische Allgemeinuntersuchung	43
2.	Mikroskopischer Nachweis von Hämogregarinen in	
	Blutausstrichen	45
2.1.	Nachweishäufigkeit	45
2.2.	Morphologie der lichtmikroskopisch nachgewiesenen Parasiten	46
3.	Genotypische Charakterisierung der Hämogregarinen	48
3.1.	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit Primern nach Perkins und Keller (2001)	48
3.2.	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit Primern nach Ujvari et al (2004)	49
3.3.	Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit Primern nach Medlin et al. (1988) und Wozniak et al. (1994)	50
4.	Ergebnisse der Sequenzierung	51
5.	Ergebnisse der Sequenzanalysen	54
5.1.	Paarweises Alignment	54
5.2.	BLAST-Analyse	58
6.	Ergebnisse der phylogenetischen Analysen	63
6.1.	Vergleich der phylogenetischen Beziehungen der	
	Hämogregarinen mit der Art oder geographischen Herkunft	
	der Reptilienwirte	66

7.	Vergleich der erhaltenen Hämogregarinen-Sequenzen mit der Morphologie der lichtmikroskopisch nachgewiesenen Stadien in den Erythrozyten des Reptilienwirts	69
V.	DISKUSSION	71
1.	Auswahl der Proben	71
1.1.	Anzahl einbezogener Tiere und Tierarten	71
1.2.	Vorauswahl der untersuchten Proben	71
2.	Methodik.....	72
2.1.	Lagerung der Proben.....	72
2.2.	Auswahl des Zielgens.....	72
2.3.	PCR.....	73
2.3.1.	Primer.....	73
2.3.2.	Reaktionsprotokoll	76
2.3.3.	Sequenzierungen	76
3.	Sequenzenzanalysen.....	78
3.1.	phylogenetische Einordnung.....	78
3.2.	Morphologie der erythrozytären Stadien im Vergleich mit den erhaltenen Sequenzen.....	82
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	85
VII.	SUMMARY	87
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	89
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	103
X.	TABELLENVERZEICHNIS.....	105
XI.	ANHANG.....	106
XII.	DANKSAGUNG	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
AST	Aspartat-Aminotransferase
BArtSchV	Bundesartenschutzverordnung
BfN	Bundesamt für Naturschutz
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BmJV	Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz
bp	Basenpaar
BRSK	Breitrandschildkröte
BSA	Bovines Serumalbumin
CITES	Convention of International Trade on Endangered Species of Wild Flora and Fauna
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Deoxyribonucleid acid, Dtsch. Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
ExKo	Extraktionskontrolle
G	Gauge
g	Gramm
ITS	internal transcribed spacer
IUCN	International Union for Conservation of Nature
KRL	Kopf-Rumpf-Länge

LSK	Landschildkröte
M	Marker
ml	Milliliter
MLSK	maurische Landschildkröte
mM	Millimolar
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PosKo	Positivkontrolle
rpm	revolutions per minute
syn.	synonym
TBE	Tris-Borat-EDTA
TDWG	Taxonomic database working group
UV-Licht	ultraviolettes Licht
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
W	Watt
ZZF	Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe

I. EINLEITUNG

Hämogregarinen sind Blutparasiten vom Stamm Apikomplexa, die einen zwei- bis dreiwirtigen Entwicklungszyklus besitzen. Reptilien fungieren dabei als Zwischenwirte, während Invertebraten, wie z. B. Egel, Zecken, Milben oder Mücken als die funktionellen Endwirte die Erreger zwischen Wirbeltieren übertragen. Taxonomisch wurden die bei Reptilien vorkommenden Hämogregarinenarten der Familie Hepatozoidae mit der Gattung *Hepatozoon*, der Familie Haemogregarinidae mit der Gattung *Haemogregarina*, sowie der Familie Karyolysidae mit den Gattungen *Karyolysus* und *Hemolivia* zugeordnet.

Die Erstbeschreibung einer Hämogregarinenspezies bei Reptilien fand bereits im Jahr 1884 mit *Haemogregarina stephanowi* bei der europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) statt (Danilewsky, 1884). Seither wurden ca. 400 weitere Hämogregarinenarten beschrieben. Derzeit werden die bei Schlangen nachgewiesenen Hämogregarinen vor allem der Gattung *Hepatozoon* zugeordnet (Ball et al., 1969; Bashtar et al., 1984a; Bashtar et al., 1984b; Smith, 1996), während die Erreger bei Schildkröten meist als *Haemogregarina* (Mebs, 1965; Mihalca, 2002; Strohlein and Christensen, 1984) und bei Echsen als *Karyolysus* klassifiziert werden (Haklová-Kočíková et al., 2014; Svahn, 1974). Die Gattung *Hemolivia* soll bei Schildkröten (Paperna, 2006; Siroky et al., 2004) und Echsen vorkommen (Lainson et al., 2007; Paperna and Smallridge, 2001; Smallridge and Bull, 2001). Vor allem durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden wurde in jüngster Vergangenheit aber die taxonomische Zuordnung auf Gattungsebene angezweifelt und diskutiert (Cook et al., 2014). Zudem ist in vielen Fällen die Validität der Arten umstritten, da die Artbeschreibungen häufig lediglich mit dem Vorkommens in einem neuen Wirt (Telford, 2008) oder, vor allem bei den vor 1960 beschriebenen Arten, auf der Morphologie einzelner Stadien in den Reptilien-Erythrozyten basieren. Bei den im Blut befindlichen Entwicklungsstadien der Hämogregarinen handelt es sich in der Regel um Gamonten, die sich bei den unterschiedlichen Arten morphologisch kaum unterscheiden. Daher werden diese intraerythrozytären Stadien im Vertebratenwirt als zur Artdiagnose ungeeignet angesehen (Ball, 1967) und es wurde gefordert, dazu vielmehr die Biologie der Parasiten mit den kompletten Entwicklungszyklen und der Morphologie der Stadien im Invertebraten-Endwirt oder molekularbiologische Methoden einzubeziehen (Ball and Chao, 1973; Harris

et al., 2011; Wozniak et al., 1994). Dies führte in den letzten Jahren zu einer Vielzahl von Revidierungen und Neubeschreibungen von Hämogregarinenarten bei Reptilien (Sloboda et al., 2007; Telford Jr et al., 2004).

Die Bedeutung von Hämogregarinen als Krankheitserreger bei Reptilien ist derzeit noch unklar. Es wird jedoch u.a. von Rückgang der Reproduktionsrate bei Wasserpithons (*Liasis fuscus*) (Madsen et al., 2005), verminderter Aktivität bei Tannenzapfenechsen (*Tiliqua rugosa*) (Bouma et al., 2007) und langsamerer Schwanzregeneratbildung bei Waldeidechsen (*Lacerta vivipara*) berichtet (Oppliger and Clobert, 1997).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die bei unterschiedlichen, erst kürzlich nach Deutschland importierten Reptilien unterschiedlicher Arten nachgewiesenen Hämogregarinen zu differenzieren. Dazu wurden in der vorliegenden Studie Hämogregarinen, die in einer vorangegangenen Untersuchung mittels mikroskopischer Untersuchungen im Blut von Importreptilien detektiert worden waren (Halla, 2015; Halla et al., 2014), mittels PCR und Sequenzanalysen genotypisch charakterisiert. Phylogenetische Analysen sollten dabei Informationen über eine mögliche Gattungs- und Artenvielfalt der beteiligten Einzeller liefern und Grundlagen für zukünftige Weiterentwicklungen im Bereich der Diagnostik und Epidemiologie bilden mit dem Ziel, mögliche therapeutische Ansätze zu überprüfen.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Hämogregarinen

1.1. Allgemeines

Hämogregarinen sind eine Gruppe von Blutparasiten, die bei Reptilien auftreten können und von manchen Autoren auch als Blutkokzidien bezeichnet werden (Mutschmann, 2002). Sie gehören zum Stamm Apikomplexa und haben je nach Art einen zwei- bis dreiwirtigen Entwicklungszyklus mit einem oder mehreren Reptilien als Zwischenwirt.

Die Erstbeschreibung von Hämogregarinen bei Reptilien erfolgte im Jahr 1884 mit *Haemogregarina stephanowi* bei der europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*) (Danilewsky, 1884). Seitdem wurden etwa 400 verschiedene Hämogregarinenarten beschrieben, viele davon auch bei Reptilien; die in Deutschland vorkommen oder zu beliebten Terrarientieren zählen, z. B. *Karyolysus lacertae* bei der einheimischen Mauereidechse (*Podarcis muralis*) (Reichenow, 1921) oder *Hemolivia mauritanica* bei maurischen Landschildkröten (*Testudo graeca*) und Breitrandsschildkröten (*Testudo marginata*) (Paperna, 2006; Siroky et al., 2004). Beide Schildkrötenarten werden in Deutschland sehr häufig gehalten. *Hepatozoon fusifex* wurde 1969 bei Abgottschlangen (*Boa constrictor*) beschrieben (Ball et al., 1969), welche ebenfalls beliebte Terrarientiere darstellen. Weitere Beispiele sind *Hepatozoon ayorgbor* beim Königspython (*Python regius*) (Sloboda et al., 2007), *Hepatozoon sauritus* bei Kornnattern (*Pantherophis guttatus*), Erdnattern (*Elaphe obsoleta*) und Strumpfbandnattern (*Thamnophis sirtalis*) (Telford Jr et al., 2004), *Hepatozoon karyolysi* und *Hepatozoon rexi* bei der Florida-Kettennatter (*Lampropeltis getula floridana*) (Telford Jr., 2010), *Haemogregarina parvula* bei Pantherschildkröten (*Stigmochelys pardalis*) (Cook et al., 2009) und *Haemogregarina balli* bei mittelländischen Zierschildkröten (*Chrysemys picta marginata*) (Siddall and Dessler, 2001).

1.2. Taxonomie

Die taxonomische Einordnung der Hämogregarinen unterliegt auf Gattungs-, aber vor allem auf Artebene derzeit einem starken Wandel, da u. a. aufgrund von Erkenntnissen aus modernen, molekulargenetischen Untersuchungsverfahren,

aber auch aufgrund der Identifizierung neuer Wirbeltier- und Invertebratenwirte, die die Parasiten auf Reptilien übertragen, laufend Neubeschreibungen und Umbenennungen stattfinden (Ball et al., 1967; Booden et al., 1970; Cook et al., 2009; Siddall, 1995; Sloboda et al., 2007; Sloboda et al., 2008; Telford Jr et al., 2004).

Die Hämogregarinen werden den Apikomplexa zugeordnet, die auch als Sporozoa bezeichnet werden (Mehlhorn, 2008; Tenter and Schnieder, 2006) und zusammen mit den Dinoflagellata und Ciliophora Unterstämme des Stammes Alveolata bilden. Charakteristisches Merkmal der Apikomplexa ist der sog. Apikalkomplex, der der Penetration der Wirtszelle dient. TENTER und SCHNIEDER (2006) unterteilten den Unterstamm der Apikomplexa in die Klassen Coccidia und Haematozoa. Die Klasse Coccidia spaltete sich dabei in die Ordnungen Adeleida und Eimeriida weiter auf. Die Begriffe Hämogregarinen und Hämokokzidien werden unterschiedlich verwendet. So benutzt MUTSCHMANN (2002) beide Begriffe als Synonyme und bezieht hier die zu den Eimeriida zählende Familie Lankesterellidae mit den Gattungen *Schellackia* und *Lankesterella* sowie die Familien Haemogregarinidae, Hepatozoidae und Karyolysidae ein. TELFORD (2008), an dessen Einteilung sich in dieser Dissertation gehalten wird, unterscheidet dagegen zwischen Hämokokzidien und Hämogregarinen. Dabei bezeichnet er die zur Familie Lankesterellidae gehörenden Gattungen als Hämokozidien und die Familien Haemogregarinidae, Hepatozoidae, und Karyolysidae als Hämogregarinen (Telford, 2008). Zu der Familie Haemogregarinidae zählen die bei Reptilien bedeutende Gattung *Haemogregarina* sowie die bei Fischen parasitierenden Gattungen *Cyrilia* und *Desseria*. Die Familie Hepatozoidae besteht aus der Gattung *Hepatozoon*, deren Arten als bedeutende Parasiten nicht nur bei Reptilien, sondern auch bei Säugetieren bekannt sind. Die Familie Karyolysidae teilt sich in die Gattungen *Karyolysus* und *Hemolivia* auf (Mutschmann, 2006; Tenter and Schnieder, 2006).

Abbildung 1 zeigt die taxonomische Einordnung der Hämogregarinen.

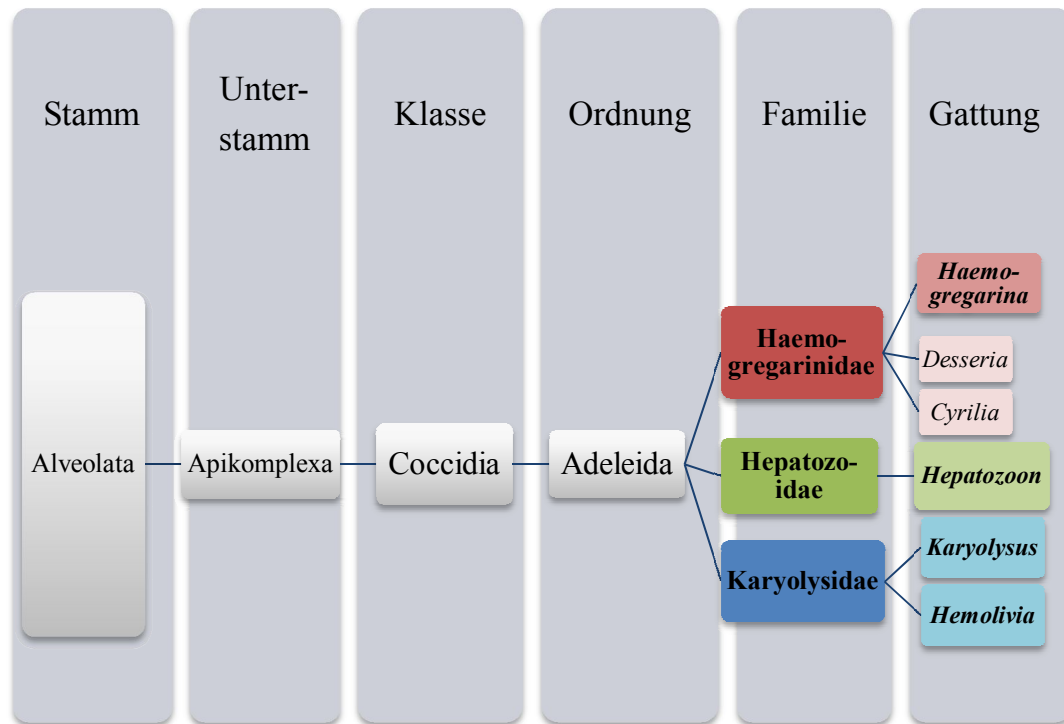


Abbildung 1: Taxonomie der Hämogregarinen

1.3. Entwicklungszyklus

Hämogregarinen haben einen zwei- bis dreiwirtigen Entwicklungszyklus. Da im Reptil die ungeschlechtliche Entwicklung (Merogonie und Schizogonie) und im Invertebratenwirt die geschlechtliche Entwicklung (Gamogonie) und eine ungeschlechtliche Vermehrung (Sporogonie) des Parasiten stattfindet, stellen Reptilien definitionsgemäß den Zwischenwirt dar (Ball and Chao, 1973; Landau et al., 1972; Reichenow, 1921; Siddall and Desser, 1991; Smith, 1996). Von vielen bei Reptilien beschriebenen Hämogregarinenarten ist der Entwicklungszyklus gar nicht oder nur teilweise bekannt (Cook et al., 2009; Siroky et al., 2007; Sloboda et al., 2007; Telford, 2008). Vor allem bei den älteren Publikationen ergibt sich zusätzlich die Schwierigkeit, dass die Entwicklungsstadien (v.a. Gamonten und Gametozyten) nicht immer korrekt bezeichnet werden.

Im Folgenden werden Beispiele von Hämogregarinenarten dargestellt, bei denen der Entwicklungszyklus bereits komplett oder zumindest größtenteils beschrieben wurde.

1.3.1. Karyolysidae

1.3.1.1. *Karyolysus lacertae*

Der deutsche Protozoologe Eduard REICHENOW stellte bereits 1921 sehr detailliert den Entwicklungszyklus von *Karyolysus lacertae* dar, einem Blutparasiten, der die Mauereidechse (*Podarcis muralis*) befällt (Reichenow, 1921).

Karyolysus lacertae wurde 1886 erstmals durch DANILEWSKY beschrieben und wenige Jahre später von LABBÉ auch *Karyolysus lacertarum* genannt (Labbé, 1899). *Karyolysus lacertae* syn. *Karyolysus lacertarum* vermehrt sich durch Schizogonie im Gefäßendothel der inneren Organe der Mauereidechse (*Podarcis muralis*). Dabei entwickeln sich aus einem Schizonten acht bis 30 Merozoiten, welche erneut Endothelzellen befallen. Nach mehreren Zyklen von Schizogonien entwickeln sich aus den Merozoiten der letzten Generation Vorstufen geschlechtlicher Stadien, die sogenannten Gamonten, welche in Erythrozyten eindringen, um sich dort zu verkapseln. Durch Blutsaugen an ihrem Wirt, der Mauereidechse, nehmen Milben der Art *Ophionyssus saurorum* die gamontenhaltigen Erythrozyten auf. Im Darm der Milben werden die Gamonten aus den Erythrozyten frei, und es entstehen zunächst Makro- und Mikrogamonten, die sich aneinanderlagern und von Darmzellen der Milben aufgenommen werden. Sie entwickeln sich zu Mikro- und Makrogameten weiter und bilden eine Zygote. Bei der anschließenden Sporogonie entstehen bewegliche Formen, die von REICHENOW (1921) als Sporokineten bezeichnet wurden. Die Sporokineten wandern in die Eier der Milben ein, werden also transovarial übertragen und vermehren sich in den entstehenden Milbenlarven und -nymphen intrazellulär in Form einer sogenannten Sporogonie. Während der Entwicklung der Milben vom Ei bis zur Nymphe reifen die Sporozoiten, das infektiöse Stadium für den Wirbeltierwirt, heran. Ob im Laufe der Entwicklung von *Karyolysus lacertae* Oozysten und Sporozysten im engeren Sinne in den Milben ausgebildet werden (Reichenow 1921, Telford 2008), oder ob diese Stadien fehlen (Mehlhorn 2008), ist derzeit noch unklar. Wenn die Mauereidechse (*Podarcis muralis*) die Nymphen erbeutet und zerbeißt, werden die Sporozoiten im Darm dieser Reptilien freigesetzt, gelangen durch das Darmepithel in den Blutkreislauf der Eidechse und dringen schließlich in Endothelzellen der Gefäße innerer Organe, um sich dort wieder ungeschlechtlich durch Schizogonie zu

vermehrten (Mehlhorn, 2008; Reichenow, 1921; Telford, 2008). In Abbildung 2 wird der Lebenszyklus von *Karyolysus lacertae* schematisch dargestellt.

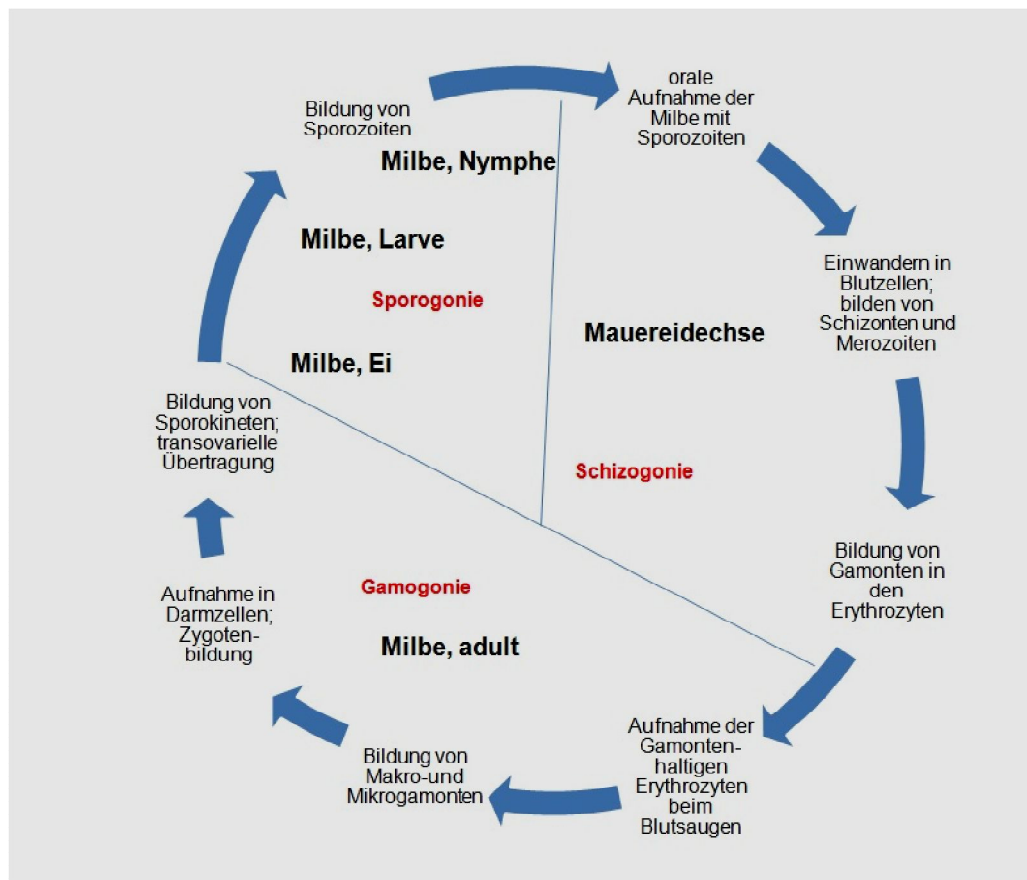


Abbildung 2: schematische Übersicht des Lebenszyklus von *Karyolysus lacertae*

1.3.1.2. *Hemolivia stellata*

PETIT et al. (1990) beschrieben den Entwicklungszyklus von *Hemolivia stellata* im natürlichen Wirt, der Agakröte (*Bufo marinus* syn. *Rhinella marina*). Diese Parasitenart befällt aber wahrscheinlich auch Echsen der Art grüne Ameive (*Ameiva ameiva*), die in Brasilien im gleichen Lebensraum vorkommt, da bei diesen Echsen natürliche Infektionen mit morphologisch identischen Erregern nachgewiesen wurden und experimentelle Infektionen mit *Hemolivia stellata* erfolgreich waren (Lainson et al., 2003; Lainson et al., 2007).

Als Endwirt für *Hemolivia stellata* und damit Überträger auf den Reptilien- bzw. Amphibienzwischenwirt wurde die Zeckenart *Amblyomma rotundatum*, teilweise auch irrtümlicherweise als *Amblyomma rotundatum* bezeichnet, nachgewiesen bei der die Hämogregarinen transstadial weitergegeben werden (Petit et al., 1990). Zeckenlarven oder -nymphen nehmen beim Blutsaugen am infizierten

Wirbeltierwirt Erythrozyten mit als Gametozyten bezeichneten Stadien auf. Im Zeckendarm verlassen die Gametozyten die Erythrozyten und wandern in Zellen des Verdauungstraktes ein. Dort erfolgt die Befruchtung und entwickelt sich innerhalb von 15 Tagen über ein kugelförmiges und ein sternförmiges Stadium die reife Oozyste, die 100-150 Sporokineten enthält. Die Sporokineten verlassen ihre Wirtszelle und befallen neue Zellen des Verdauungstraktes, in denen sie sich zu Sporozysten, die 8-24 Sporozoiten enthalten, weiterentwickeln. Ein Teil der Sporozysten persistiert in Darmzellen der Zecken über die Häutung zum nächsten Zeckenentwicklungsstadium hinaus, während ein anderer Teil der Sporozysten im Verlauf der Verdauung der Blutmahlzeit mit dem Kot der Zecke ausgeschieden wird. Die Sporozysten können in der Außenwelt mehrere Tage überleben und von Stapelwirten (paratenischen Wirten), in denen sie sich nicht weiterentwickeln, aufgenommen werden (Petit et al 1990).

Übertragungswege von *Hemolivia stellata* auf die Agakröte (*Rhinella marina*) sind sehr vielfältig. Die Kröte kann sich einerseits über Sporozysten infizieren, und zwar durch orale Aufnahme einer infizierten Zecke mit Sporozysten, durch Aufnahme von Sporozysten aus der Umwelt oder durch Aufnahme eines Sporozysten enthaltenden paratenischen Wirtes, und andererseits auch durch Prädation von Vertebraten mit Aufnahme von Zysten, die im Laufe der Schizogonie im Vertebratenwirt in Erythrozyten und in Zellen des retikuloendothelialen Systems gebildet werden. Im Verdauungstrakt der Kröte werden die Sporozoiten oder Merozoiten frei. Anschließend finden Schizogonien in Erythrozyten und in Zellen des retikuloendothelialen Systems statt. Dabei entsteht zunächst eine geringe Anzahl großer Merozoiten, aus denen sich dann eine Vielzahl kleinerer Merozoiten bildet, die sich zu Gametozyten weiterentwickeln und von der Zecke bei ihrer Blutmahlzeit aufgenommen werden können (Petit et al., 1990).

1.3.2. Hepatozoidae

1.3.2.1. *Hepatozoon domerguei*

Die französische Arbeitsgruppe um LANDAU und MICHEL beschrieb 1972 nach einem Forschungsaufenthalt in Madagaskar den Entwicklungszyklus von *Hepatozoon domerguei*, einem Blutparasiten der Schlangenart *Madagascarophis colubrina* (engl.: Malagasy cat-eyed snake, kein deutsche Name vorhanden) und der Leguanart *Oplurus cuvieri* syn. *Oplurus sebae* (großer Madagaskar

Baumleguan). (Landau et al., 1972).

Hepatozoon domerguei wurde im Labor experimentell über die blutsaugenden Mücken *Culex pipiens fatigans* auf *Madagascaphis colubrina* und über *Anopheles stephensi* auf den großen Madagaskar Baumleguan (*Oplurus cuvieri*) übertragen. Im Falle der Leguane, deren Nahrung hauptsächlich aus Insekten besteht, kam die Infektion durch orale Aufnahme und Zerbeißen der Mücken zustande (Landau et al., 1972). Diese Versuche ergaben, dass die Mücken beim Blutsaugen am infizierten Reptil mit ihrer Mahlzeit mit Gamonten gefüllte Erythrozyten aufnehmen. Im Magen der Mücke werden die Gamonten umgehend aus den Erythrozyten freigesetzt, wandern durch die Magenwand und befinden sich bereits sechs Stunden nach dem Saugakt im Hämozöl der Mücke. Die Konjugation von Makro- und Mikrogamont, die Befruchtung mit Bildung der Zygote und schließlich der Oozyste erfolgt entweder frei im Hämozöl oder in einer Fettkörperzelle.

LANDAU et al. (1972) beschrieben, dass sich im Laufe der von ihnen durchgeführten experimentellen Infektion verschiedene Formen von Oozysten entwickelten, die auch unterschiedliche Formen der Infektion hervorzurufen schienen. Einige Oozysten entwickelten sich schnell (innerhalb von 10 Tagen), waren von kleinerem Durchmesser und enthielten nur wenige Sporozysten. Die anderen Oozysten entwickelten sich langsam innerhalb von 20-25 Tagen und enthielten deutlich mehr Sporozysten. Da sich diese Beobachtung in keiner weiteren Publikation finden lässt und es sich bei den in der Studie von LANDAU et al. (1972) verwendeten Reptilien um Wildfänge handelte, lässt sich allerdings nicht ausschließen, dass es sich bei den hier beschriebenen Formen möglicherweise um Oozysten verschiedener *Hepatozoon* sp. handelt.

Unter Laborbedingungen versuchten LANDAU et al. (1972) verschiedene aus Madagaskar stammende Reptilienspezies (großer Madagaskar Baumleguan (*Oplurus cuvieri* syn. *Oplurus sebae*), Malagasy cat-eyed snake (*Madagascaphis colubrina*), Madagaskar Hakennasennattern (*Leioheterodon modestus*)), sowie Felsenpythons (*Python sebae*) aus Afrika und Mauereidechsen (*Podarcis muralis*) aus Europa experimentell zu infizieren. Im natürlichen Wirt, dem großen Madagaskar Baumleguan (*Oplurus cuvieri*) fand die Merogonie zunächst in der Leber statt. Es fanden sich Makromeronten, die je 30 Makromerozoiten enthielten, im Leberparenchym. Außerdem entstanden einzelne Gewebszysten.

LANDAU et al. (1972) stellten die Theorie auf, dass es sich bei den von ihnen beschriebenen Gewebszysten möglicherweise um Schizonten-Vorstufen handeln könnte. Mikromeronten, die aus einer weiteren Merogonie resultieren, fanden sich in Gefäßendothelzellen aller Organe, jedoch vor allem in der Lunge. Im reifen Zustand enthielten die Mikromeronten bis zu 100 Mikromerozoiten, die in die Erythrozyten wanderten und sich dort zu Gamonten entwickelten (Telford, 2008). Nach Erregerübertragung durch infizierte Mücken entstand bei den in Madagaskar heimischen Schlangen *Madagascophis colubrina* und *Leioheterodon modestus* ebenfalls eine typische *Hepatozoon*-Infektion mit Makro- und Mikromeronten in den Geweben, Gamonten in den Erythrozyten und Gewebszysten.

Bei ihren Experimenten nutzten LANDAU et al. (1972) zwei unterschiedliche, mögliche Wege der Infektion der Reptilien. Einem Teil der Reptilien wurden mit *H. domerguei* infizierte Mücken, dem anderen Teil wurden Organteile (Leber und Lunge) infizierter Reptilien verfüttert. Bei den aus Madagaskar stammenden Spezies (großer Madagaskar Baumleguan (*Oplurus cuvieri* syn. *Oplurus sebae*), Malagasy cat-eyed snake (*Madagascophis colubrina*) und Madagaskar Hakennasennattern (*Leioheterodon modestus*)) und bei den Felsenpythons aus Afrika führte die orale Aufnahme infizierter Mücken zu einer typischen *Hepatozoon* sp. -Infektion. Während das Verfüttern von Gewebszysten aus der Leber eines großen Madagaskar Baumleguans (*Oplurus sebae*) bei Felsenpythons (*Python sebae*) ebenfalls zu einer Infektion führte, bildeten sich bei europäischen Mauereidechsen (*Podarcis muralis*) lediglich Gewebszysten. Es wurde daher gefolgert, dass die europäische Mauereidechse bei einer *Hepatozoon domerguei*-Infektion nur als erster Zwischenwirt eine Rolle spielen kann (Landau et al., 1972).

Nach den Untersuchungen von LANDAU et al. (1972) handelt es sich beim Zyklus von *Hepatozoon domerguei* somit um einen dreiwirtigen Zyklus. Dabei fungiert ein Insekt als Endwirt, ein insektenfressendes Reptil als erster und eine Schlange als zweiter Zwischenwirt.

Die Schlangen infizieren sich durch Gewebszysten in Leber und Lunge des ersten Zwischenwirtes. Verschiedene Schlangen ließen sich experimentell jedoch auch durch die orale Gabe von *Hepatozoon domerguei* - Oozysten aus Mücken infizieren, so dass auch ein zweiwirtiger Zyklus möglich sein könnte (Landau et

al., 1972).

1.3.2.2. *Hepatozoon sipedon*

SMITH, DESSER und MARTIN beschrieben 1994 den Lebenszyklus von *Hepatozoon sipedon*, bei dem neben den als Vektoren dienenden Stechmücken *Culex pipiens* und *Culex territans* und einem natürlichen Reptilien-Wirt, der Siegel-Ringelnatter (*Nerodia sipedon*) ein zusätzlicher obligater Wirbeltier-Zwischenwirt, der Leopardfrosch (*Rana pipiens*) einbezogen wird (Smith et al., 1994).

Die Mücken infizieren sich durch die Aufnahme gamontenhaltiger Erythrozyten beim Blutsaugen an der Schlange. Im Verdauungstrakt der Mücke werden die Gamonten aus den Erythrozyten frei. In Fettkörperzellen der Mücken finden in parasitophoren Vakuolen die Gametogenese, die Befruchtung und die Sporogonie statt. Die dabei entstehende Oozyste reift innerhalb von 28 Tagen heran und enthält am Ende durchschnittlich 600 Sporozysten. Jede Sporozyste enthält acht Sporozoiten.

Frisst ein Leopardfrosch eine infizierte Mücke, werden in seinem Verdauungstrakt die Sporozoiten frei. Nach sieben Tagen bilden sich in den Hepatozyten des Frosches Zysten, die jeweils zwei Zystozoiten enthalten (dizoische Zysten).

Wenn eine Siegel-Ringelnatter (*Nerodia sipedon*) einen infizierten Leopardfrosch erbeutet, werden die Zystozoiten in ihrem Darm frei. Nach 12 Tagen finden sich in den Hepatozyten und Zellen anderer Organe der Schlange reife Makromeronten. Aus diesen werden Makromerozoiten frei, die verschiedene Zellen der Schlange befallen. Die Mikromeronten, die sich ebenfalls in den Hepatozyten und in Zellen anderer Organe (Lunge, Niere, Herz) finden und nach 30 Tagen reif sind, setzen Mikromerozoiten frei, die in Erythrozyten eindringen und dort Gamonten formen, die wiederum für die Mücken infektiös sind.

Abbildung 3 zeigt eine schematische Übersicht des Entwicklungszyklus von *Hepatozoon sipedon*.

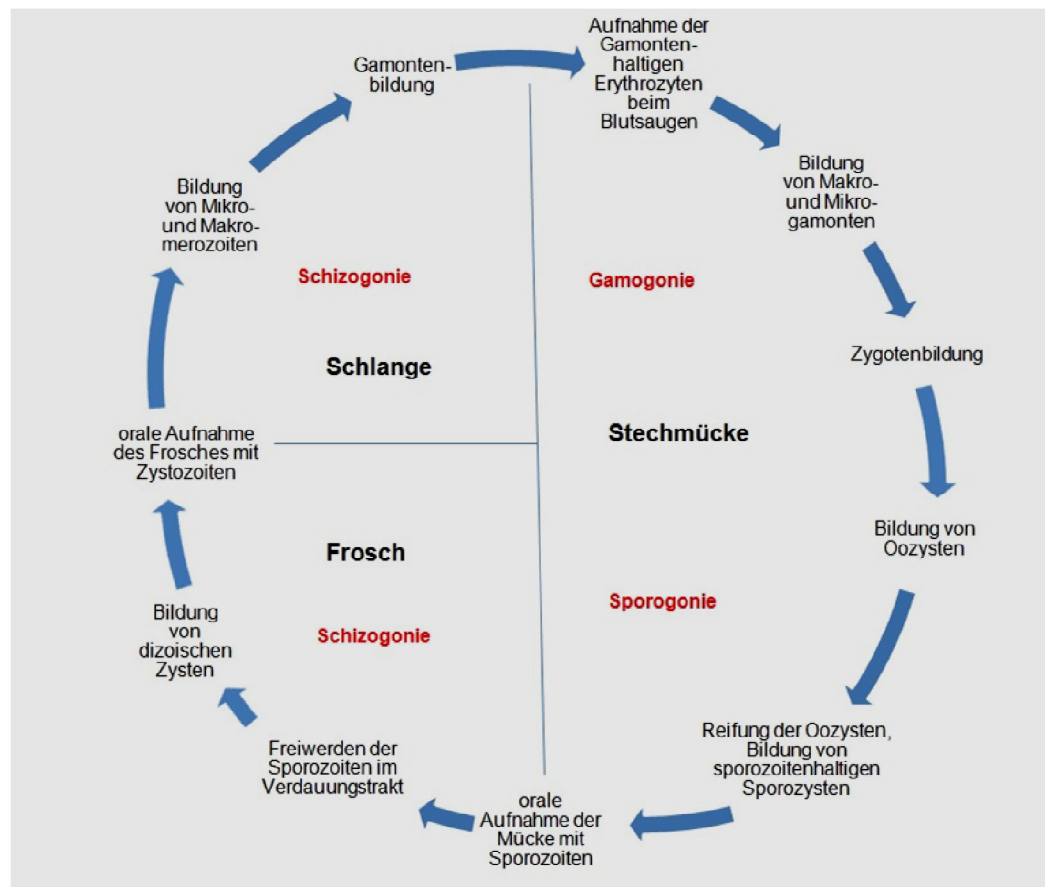


Abbildung 3: schematische Übersicht über den Entwicklungszyklus von *Hepatozoon sipedon*

1.3.3. Haemogregarinidae

1.3.3.1. *Haemogregarina balli*

SIDDALL und DESSER beschäftigten sich 1991 mit dem Entwicklungszyklus der erstmals von PATERSON und DESSER (1976) im Blut von Schnappschildkröten (*Chelydra serpentina*) beschriebenen Hämogregarinenart *Haemogregarina balli*. In Folgearbeiten beschrieben SIDDALL und DESSER (1992, 2001) *Haemogregarina balli* auch bei Zierschildkröten (*Chrysemys picta marginata*) und Waldbachschildkröten (*Clemmys insculpta*), die im gleichen Gebiet wie die Schnappschildkröten (*Chelydra serpentina*) vorkommen. Als Endwirt und gleichzeitig Überträger von *Haemogregarina balli* auf die einzelnen Schildkrötenarten wurde die Egelart *Placobdella ornata* experimentell bestätigt (Siddall and Dessser, 2001).

Beim Saugvorgang des Egels gelangen infektiöse Merozoiten über den Rüssel in die Schildkröte und befallen Zellen von Leber, Lunge und Milz. In diesen Zellen findet eine erste Merogonie (Schizogonie) mit Bildung von je 18 Merozoiten pro

Meront statt. Im weiteren Verlauf der Infektion dringen diese Merozoiten dann in Erythrozyten ein, wo sie sich zu Meronten weiterentwickeln und je acht Merozoiten pro Meront gebildet werden. Aus den in den Erythrozyten gebildeten Merozoiten entstehen innerhalb von 12 Wochen in weiteren Erythrozyten entweder neue Meronten oder Gamonten. Die im Blut zirkulierenden intraerythrozytären Mikro- und Makrogamonten werden beim Saugakt vom Egel aufgenommen.

Im Verdauungstrakt des Egels lagern sich Mikro- und Makrogamonten zusammen. Aus dem Mikrogamonten entstehen vier geißellose Mikrogameten, von denen einer den zugehörigen Makrogameten befruchtet. Bei der nachfolgenden Sporogonie entstehen direkt in der Oozyste acht Sporozoiten. Die Sporozoiten wandern ins vordere Somit des Egels und entwickeln sich zu Meronten, die etwa 250 Merozoiten enthalten. Die Merozoiten wandern zum Rüssel des Egels, wo sie beim Saugakt in die Blutzirkulation der Schildkröte abgegeben werden (Siddall and Desser, 1991).

In Abbildung 4 ist der Entwicklungszyklus von *Haemogregarina balli* schematisch dargestellt.

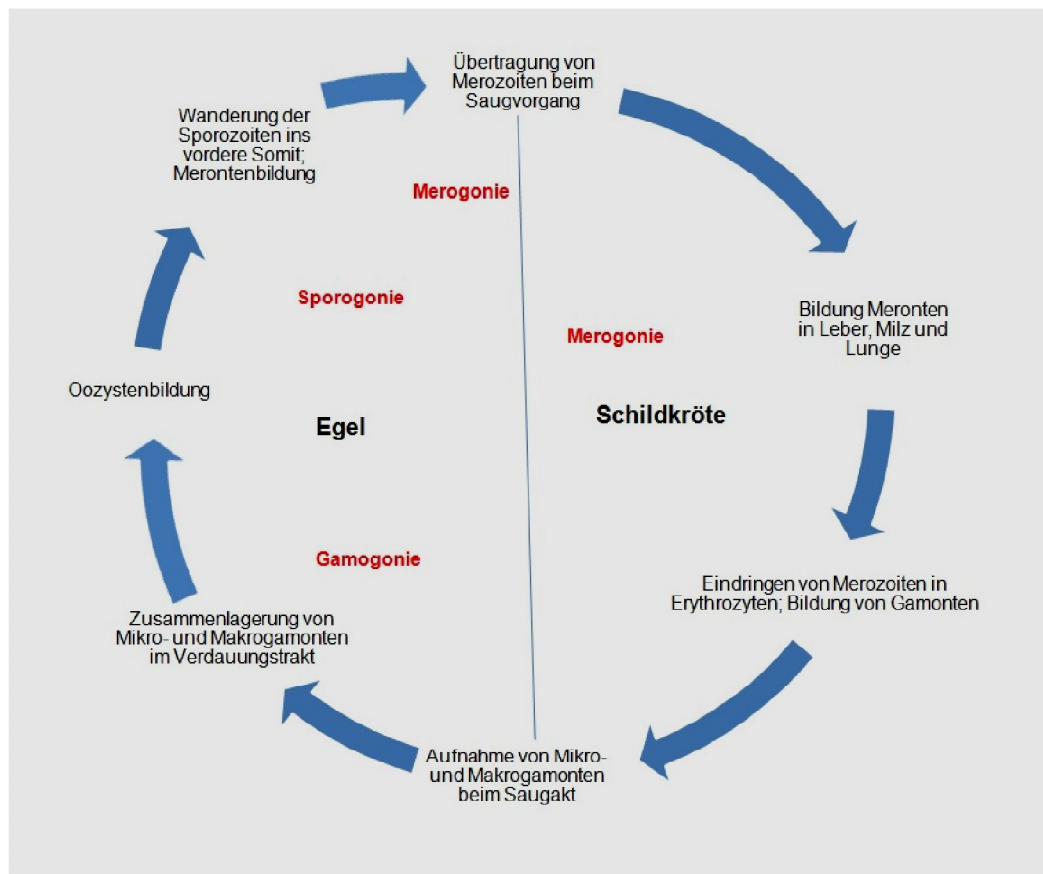


Abbildung 4: schematische Übersicht über den Entwicklungszyklus von *Haemogregarina balli*

1.4. Morphologie der intraerythrozytären Formen

Bei den in den Reptilienerythroyten vorkommenden Formen von Hämogregarinen handelt es sich in der Regel um Gamonten. Bei *Haemogregarina sp.* wurden sie teilweise auch als Meronten bezeichnet. Die Gamonten haben eine längliche, manchmal auch rundliche oder bananenförmige Form und können den Zellkern der Wirtszelle verdrängen oder für Änderungen ihrer Form und Größe verantwortlich sein. Die intraerythrozytären Gamonten der unterschiedlichen Hämogregarinenarten sind morphologisch schwer bis gar nicht zu unterscheiden. Für eine sichere Artdiagnose werden daher die Stadien im Endwirt, Kenntnisse über den Entwicklungszyklus oder molekularbiologische Daten benötigt (Ball et al., 1967; Wozniak et al., 1994).

In Tabelle 1 sind die Maße und Besonderheiten einiger in der Literatur morphologisch beschriebener Arten dargestellt.

Tabelle 1: Wirbeltierwirte und Morphologie der intraerythrozytären Formen einiger Hämogregarinenarten

Art	Hepatozoidae			
	<i>Hepatozoon ayorgbor</i>	<i>Hepatozoon robertsonae</i>	<i>Hepatozoon domerguei</i>	<i>Hepatozoon sipedon</i>
Wirbeltier- wirt	<i>Python regius</i>	<i>Python regius</i> , <i>Python sebae</i>	<i>Oplurus cuvieri</i> , <i>Madagascophis colubrina</i> , <i>Python sebae</i> (experimentell)	<i>Nerodia sipedon</i>
Größe der Gamonten	12,2 x2,9 µm; Kern länglich 5,2 x1,6 µm	12-16x? µm	14x3 µm,	19x3,7 µm,
Besonder- heiten	Breit und länglich, nicht gebogen, Kern der Wirtzelle wird in der Regel auf eine Seite verdrängt		Kern randständig, Form relativ variabel	nie gebogen, Kern fast eiförmig
Referenz	Sloboda et al., 2007	Samson und Seligmann, 1907	Landau et al., 1972	Smith et al., 1994

<i>Hepatozoon rarefaciens</i>	<i>Hepatozoon fusifex</i>	<i>Hepatozoon sauritus</i>	Karyolysidae			
<i>Drymarchon corais</i> , <i>Boa constrictor</i>	<i>Boa constrictor</i>	<i>Thamnophis sauritus sackenii</i> , <i>Thamnophis sirtalis</i> , <i>Elaphe obsoleta</i> , <i>Elaphe guttata</i> , <i>Coluber</i>				
15,4x5,5 µm,	9,2-17,3x2,3-8,1 µm	13-19x2,5-5 µm, Kern 3-7,5x1,5-5,5 µm				
Kern in unterschiedlicher Position, Hypertrophie der befallenen Erythrozyten	infizierte Erythrozyten sind oft spindelförmig	schmal, nicht gebogen, infizierte Erythrozyten sind länger als nichtinfizierte				
Ball et al., 1967	Ball et al., 1969	Telford Jr et al., 2004				

<i>Karyolysus lacertae</i>	<i>Hemolivia stellata</i>
<i>Lacerta agilis</i> , <i>Podarcis muralis</i> , <i>Lacerta vivipara</i>	<i>Bufo marinus</i> , <i>Ameiva ameiva</i>
12,3-14,6x3,9-4,6 µm,	9x5,1 µm,
hinterer Teil kurz und gebogen, Kern liegt im vorderen Teil	länglich, relativ stämmig, abgerundete Extremitäten, reife Formen von Kapsel umgeben, Kann den Kern der Wirtszelle verdrängen, verändert aber nie Form und Aussehen des
Reichenow, 1921, Telford, 2008	Lainson et al., 2007, Petit et al., 1990

<i>Hemolivia mauritanica</i>	Haemogregarinidae		
<i>Testudo graeca</i> , <i>Testudo marginata</i>			
12,5x5 µm,	12,6x5,3 µm,	12,5-24x3,4-9 µm,	
oval oder zylinderförmig, Kapsel, Kern Polständig	Kidney-Bohnen-förmig, Meronten in Erythrozyten : 14,5- 21x5-10µm, enthalten 6-8 Merozoiten	durchsichtige Kapsel, Linsenförmig, selten Meronten in Erythrozyten nachweisbar; 15-17x12- 13µm, 2-3 Kerne	
Siroky et al., 2005	Paterson und Desser, 1976, Siddall und Desser, 2001	Pienaar, 1962, Telford 2008	

1.5. Folgen des Befalls mit Hämogregarinen

Über die Folgen des Hämogregarinenbefalls für den jeweiligen Reptilienwirt finden sich nur wenige Angaben in der Literatur, und eine Bedeutung der Hämogregarinen als Krankheitserreger wird bislang nicht einheitlich beurteilt. Es ist zu vermuten, dass es Unterschiede zwischen einzelnen Wirt-Parasiten-Beziehungen gibt, und pathologische Veränderungen wurden insbesondere bei sogenannten Fehlwirten beobachtet.

Bei einer Untersuchung über den Zusammenhang zwischen dem natürlichen Befall mit Hämogregarinen und verschiedenen Lebensparametern (Verhalten gegenüber Fressfeinden, Bewegungsfähigkeit, Reproduktionsstatus, Futteraufnahme, Wachstumsrate, Ernährungszustand, Gelegegröße) bei

Kielrücken-Wassernattern (*Tropidonophis mairii*) ergab sich, dass der Befall mit Hämogregarinen keinen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Parameter hatte (Brown et al., 2006). Bei einem Befall mit *Haemogregarina balli* ließ sich auch kein Einfluss auf die Gelegegröße von Schnappschildkröten (*Chelydra serpentina*) feststellen (Brown et al., 1994). Allerdings zeigte sich bei australischen Wasserpythons (*Liasis fuscus*), dass der Befall mit Hämogregarinen zu einer geringeren Wachstumsrate, einem schlechteren Ernährungszustand und einer niedrigeren Fortpflanzungsrate führte (Madsen et al., 2005).

Ein Befall mit Hämogregarinen ging mit verlangsamter Schwanzregeneratbildung bei Waldeidechsen (*Lacerta vivipara*) einher (Oppliger and Clobert, 1997). In einer Studie über einen Zeitraum von zwei Jahren, bei der adulte Tannenzapfenechsen (*Tiliqua rugosa*) in ihrem natürlichen Habitat mittels Radiotransmittern beobachtet wurden, zeigte sich, dass mit *Hemolivia mariae* infizierte Tannenzapfenechsen (*Tiliqua rugosa*) ein deutlich kleineres Revier aufwiesen als nicht-infizierte Individuen (Bouma et al., 2007).

Durch eine Infektion mit *Hepatozoon* sp. hervorgerufene Veränderungen der Erythrozyten von Klapperschlangen (*Crotalus durissus terrificus*) hatten zudem eine verkürzte Lebensdauer der Erythrozyten, also einen schnelleren Zelltod zur Folge als physiologischerweise üblich (Miyamoto and Mello, 2007).

Ob pathologische Veränderungen und Krankheitserscheinungen auftreten, wird wahrscheinlich sehr stark davon beeinflusst, ob es sich bei dem Reptil um den natürlichen Wirt handelt, also eine im Laufe der Evolution sich entwickelte gegenseitige Anpassung vorliegt, oder ob es sich um einen evolutionär jungen oder neuen Wirt handelt. Bei einer experimentellen Infektion von mexikanischen Stachelleguanen (*Scolenoporus poinsetti*), Spitzkopfskinken (*Eumeces obsoletus*) und Zaunleguanen (*Scolenoporus undulatus*) mit *Hepatozoon mocassini*, also von Tierarten, die Fehlwirte von *Hepatozoon mocassini* darstellen, wurden zunehmende Apathie, Anorexie und eine Leukozytose sowie ein Anstieg der AST-Aktivität im Blut festgestellt. In der Sektion zeigten sich Leberzellnekrosen, Infiltrationen von Melanomakrophagen und eine deutliche Verdickung des Interstitiums der Lunge (Wozniak et al., 1996b). Bei diesen experimentell infizierten Echsen wurden Antikörper gegen *Hepatozoon mocassini* nachgewiesen und eine Beteiligung dieser Antikörper an immunpathologischen

Prozessen vermutet (Wozniak et al., 1996a). Bereits 1991 waren pathologische Veränderungen bei experimentell mit Schlangenhämogregarinen infizierten Bahamaanolis beschrieben worden (Wozniak and Telford Jr, 1991).

2. Reptilien

2.1. Allgemeines

Reptilien sind wechselwarme Wirbeltiere, die zusammen mit den Vögeln die Gruppe der Sauropsiden bilden. Sie besiedeln mit Ausnahme der Antarktis alle Kontinente und erfreuen sich in Deutschland zunehmender Beliebtheit als „Haustier“. Bei einem Großteil der gehaltenen Arten wird der Bedarf durch deutsche Nachzuchten gedeckt. Dennoch werden von bestimmten, in der Regel unter Terrarienbedingungen schwieriger nachzuzüchtenden Arten jedes Jahr etliche Reptilien nach Deutschland importiert. Genaue Zahlen über den Import und die Gesamtzahl von gehaltenen Reptilien zu erhalten gestaltet sich schwierig, da viele häufig gehaltene Spezies nicht artgeschützt sind und deshalb der Export aus den Heimatländern kaum Reglementierungen unterliegt (Auliya, 2003). Laut Gutachten des Zentralverbandes Zoologischer Fachbetriebe (ZZF) waren 2012 in 1,1 % der deutschen Haushalte Terrarien vorhanden (Anonym, 2012b). Von den Reptilienarten, die in den Anhängen von CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora, Washingtoner Artenschutzübereinkommen), einem reinen Handelsabkommen, das den Handel mit bedrohten Tierarten regelt (Anonym, 1973), und in der EU-Artenschutzverordnung (Anonym, 1996) gelistet sind, wurden im Jahr 2010 insgesamt 60422 lebende Exemplare nach Deutschland importiert (Anonym, 2010). Im Jahr 2011 waren es 74025 lebende Reptilien (Anonym, 2011), 2012 wurden insgesamt 76492 lebende, in den Anhängen A - D der EU-Artenschutzverordnung gelistete Reptilien nach Deutschland importiert (Anonym, 2012a) und im Jahr 2013 waren es sogar 98040 dieser Reptilien, die nach Deutschland importiert wurden (Anonym, 2013).

2.2. Taxonomie

Mit Stand vom August 2014 sind weltweit insgesamt 10038 verschiedene Reptilienspezies beschrieben.

Die ursprünglich als Klasse bezeichnete Gruppe der Reptilia wird in die Ordnungen Crocodylia, (Krokodile) Rhynchocephalia (Brückenechsen), Testudines (Schildkröten) und Squamata. (Schuppenkriechtiere) unterteilt. Zu den Squamata zählen die Unterordnungen Serpentes (Schlangen), Lacertilia (Echsen) und Amphisbaenia (Doppelschleichen). Da neuere phylogenetische Studien ergaben, dass die Krokodile näher mit den Vögeln als mit den restlichen Reptilien verwandt sind, die Reptilia also eine paraphyletische Gruppe darstellen, werden die ursprünglichen Klassen Vögel und Reptilien nun zur taxonomischen Gruppe der Sauropsiden zusammengefasst (Baur, 1887; Benton, 1990; Modesto and Anderson, 2004).

In die vorliegende Dissertation wurden häufig gehaltene Vertreter von Schildkröten, Echsen und Schlangen einbezogen. Da es sich bei den untersuchten Reptilien um frisch importierte Tiere handeln sollte, entsprach die Auswahl der Tiere gleichzeitig der aktuellen Nachfrage und der daraus resultierenden Verfügbarkeit an solchen erst kürzlich importierten Tieren bei den Importfirmen. Im Folgenden werden insbesondere die in der vorliegenden Untersuchung einbezogenen Arten vorgestellt.

2.2.1. Testudines

Während FRITZ und HAVAŠ im Jahr 2007 noch 328 Schildkrötenarten mit über 200 Unterarten beschrieben, waren im August 2014 schon 341 Schildkrötenarten bekannt (<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>) . Außer in der Antarktis kommen Schildkröten auf allen Kontinenten vor. Charakteristisches Merkmal der Schildkröten ist der geschlossene Panzer. Innerhalb der Ordnung unterscheidet man zwischen den Unterordnungen Cryptodira (Halsberger) und Pleurodira (Halswender). Zur Unterordnung Cryptodira zählen die Superfamilien Testudinoidea, Trionychoidea, Kinosternoidea, Cheloniodea und die Familie Chelydridae. Zu den Pleurodira gehören die Familie Chelidae und die Superfamilie Pelomedusoidea mit den Familien Pelomedusidae und Podocnemididae.

2.2.1.1. Klappbrust-Pelomedusenschildkröte (*Pelusios castaneus*)

Bei *Pelusios castaneus*, der westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröte, englisch „West African mud turtle“ oder „West African side-necked turtle“ genannt, handelt es sich um eine 1812 von SCHWEIGGER als *Emys castanea* beschriebene, tagaktive Wasserschildkrötenart. Ihr aktueller taxonomischer Status ist folgendermaßen:

- Ordnung: **Testudines**
 - Unterordnung: **Pleurodira**
 - Überfamilie: **Pelomedusidea**
 - Familie: **Pelomedusidae**
 - Gattung: ***Pelusios***

Die Schildkrötenart war bis 2007 in Anhang III des Washingtoner Artenschutzübereinkommens gelistet. Aktuell hat sie keinen besonderen Schutzstatus. Ihr natürliches Verbreitungsgebiet erstreckt sich über Flussgebiete West- und Teile Zentralafrikas .

Die Westafrikanische Klappbrust-Pelomedusenschildkröte erreicht eine Panzerlänge von bis zu 25 cm und kann über 30 Jahre alt werden. Als Nahrung dienen Kleinkrebse, kleinere Fische, Schnecken, Insekten, Wasserpflanzen und Obst. Weibliche Tiere können mehrmals im Jahr bis zu 18 hartschalige Eier legen (Ernst, 1989).

Die Schildkröte hat einen abgeflachten Rückenpanzer, der von brauner oder graubrauner Farbe ist. Im vorderen Drittel des Plastrons befindet sich ein Gelenk, so dass der kraniale Teil des Plastrons mobil ist und zugeklappt werden kann. Der Kopf der Tiere erscheint verhältnismäßig groß. An den Beinen befinden sich je fünf Zehen mit kräftigen Krallen. Die Farbe der Haut ist grau. Das Plastron ist von hellgelber bis brauner Farbe (Ernst, 1989).

Laut Gutachten über die Mindestanforderungen an die Haltung von Reptilien (Anonym, 1997) muss bei einer Haltung dieser Schildkrötenart für zwei Tiere ein Aquarium mit einer Länge, die mindestens das Vierfache der Panzerlänge beträgt, und einer Breite von mindestens der doppelten Panzerlänge des Tieres vorhanden sein. Der Wasserstand sollte mindestens das Zweifache der Panzerbreite der Schildkröte betragen. Da man diese Schildkröte in freier Natur in Flusssystemen findet, sollte auch im Aquarium ein entsprechender Bodengrund angeboten werden. Außerdem muss auf einen ausreichenden UV-

B-Licht-Anteil in der Beleuchtung geachtet werden. Die Wassertemperatur sollte 26- 28 °C betragen, die Lufttemperatur am Sonnenplatz zwischen 35 °C und 40 °C.

2.2.2. Squamata

Die Schuppenkriechtiere stellen mit aktuell 9671 Arten die größte Reptilienordnung dar. In dieser Ordnung bildet die Unterordnung Amphisbaenia (Doppelschleichen) mit 188 beschriebenen Arten den geringsten Anteil, während innerhalb der Unterordnung Serpentes (Schlangen) 3496 Arten bekannt sind und die Unterordnung der Lacertilia (Echsen) 5987 Arten umfasst. Die Unterordnung Serpentes lässt sich in die Überfamilien Acrochordoidea, Uropeltoidea, Pythonoidea, Boidea, Colubridea und Typhloidea unterteilen. Im Deutschen werden die Überfamilien Pythonoidea und Boidea unter dem Begriff Riesenschlangen zusammengefasst. Vertreter dieser beiden Überfamilien werden in Deutschland häufig gehalten und wurden auch für diese Dissertation ausgewählt.

Die Unterordnung Lacertilia lässt sich in die Teilordnungen Iguania, Gekkota, Scincomorpha, Diploglossa, Dibamia, Platynota und die Superfamilie Shinosauroidae unterteilen.

2.2.2.1. Königspython (*Python regius*)

Python regius, der Königspython (Englisch: „ball python“), wurde erstmals 1802 von SHAW als *Boa regia* beschrieben. Die aktuelle taxonomische Einordnung ist wie folgt:

- Ordnung: **Squamata**
 - Unterordnung: **Serpentes**
 - Überfamilie: **Pythonoidea**
 - Familie: **Pythonidae**
 - Gattung: ***Python***

Der Königspython ist in Anhang B der EU-Artenschutzverordnung und in Anhang II des Washingtoner Artenschutzübereinkommens gelistet. Er ist jedoch in Deutschland von der Meldepflicht nach BArtSchV (Bundesartenschutzverordnung) bei der unteren Naturschutzbehörde ausgenommen (Anonym, 2005).

Sein natürliches Verbreitungsgebiet erstreckt sich über Feucht- und

Trockensavannen großer Teile Westafrikas .

Königspythons können über 20 Jahre alt und bis zu 2 m lang werden. In der Regel erreichen sie jedoch nur eine Größe von ca. 1,3 m. Damit ist der Königpython der kleinste Vertreter der Pythons. Da sich die Tiere im Regelfall sehr ruhig verhalten, werden sie oft als sogenannte „Anfängerschlangen“ gehandelt, was zu einer weiten Verbreitung in Privathand führte (Coborn, 1995).

Die Grundfärbung des Königspythons ist hell- bis dunkelbraun mit einem von der Rückenlinie ausgehenden Band, das lateral in vielen runden bis länglichen beigegelben Flecken ausläuft. Die Bauchschuppen sind meist beige. Neben der Nominatform sind jedoch zahlreiche Farbmorphen im Handel erhältlich (Broghammer, 2012; O'Shea and Halliday, 2007).

Königspythons haben wie alle Pythons und Boas rudimentäre Hintergliedmaßen in Form von Aftersporen, die zur Geschlechtsbestimmung herangezogen werden können, da diese bei männlichen Tieren in der Regel deutlicher ausgeprägt sind. Beim Königpython sind auch noch knöcherne Beckenrudimente vorhanden (Salomon et al., 2008).

Bei Königspythons handelt es sich um ovipare Schlangen. Weibliche Tiere legen 3-14 Eier, auf denen sie sich im Anschluss zum Schutz des Geleges zusammenrollen.

Der Königpython ist dämmerungs- bis nachtaktiv und nimmt seine Beute (i.d.R. kleine Nager und Vögel) vor allem mittels Infrarotortung mit Hilfe der sich in seiner Oberlippe befindlichen Labialgruben (Abbildung 5) wahr. Im ursprünglichen Verbreitungsgebiet sind Königspythons wichtige Nützlinge, da sie den Nagerbestand und damit durch diesen übertragene Krankheiten reduzieren (Auliya and Schmitz, 2010).



Abbildung 5: Kopfportrait eines Königspythons. Die Pfeile markieren die Labialgruben

Tagsüber halten sich Königspythons häufig in Verstecken auf, wozu sie in freier Wildbahn vor allem verlassene Termitenhügel nutzen. Droht ihnen Gefahr, zeigen Königspythons ein charakteristisches Verhalten: Sie rollen ihren Körper knäuelartig um den in der Mitte liegenden Kopf zusammen. Dieses Verhalten führte zu der englischen Bezeichnung „ball python“ (O'Shea and Halliday, 2007).

Für die Haltung im Terrarium sollte für ein Paar Königspythons laut Gutachten über die Mindestanforderungen von Reptilien (Anonym, 1997) ein Terrarium mit mindestens einer Länge, die der Körperlänge der sich darin befindlichen Tiere entspricht, einer Breite, die der Hälfte der Körperlänge der Schlangen und einer Höhe, die 0,75 der Körperlänge der Königspythons entspricht, zur Verfügung stehen. Da es sich bei Königspythons um Bodenbewohner handelt, sollte die Bodentemperatur bei 28 – 30 °C, mit einer lokalen Erwärmung auf ca. 33 °C liegen. Nachts sollte die Temperatur auf ca. 26 °C abgesenkt werden. Die relative Luftfeuchte im Terrarium sollte 60 – 80 % betragen (Coborn, 1995). Als Bodengrund eignet sich lockeres, saugfähiges Substrat, wie z. B. Erde. Außerdem sollten Kletteräste, (enge) Versteckmöglichkeiten und eine Wetbox, also ein feuchteres Versteck, angeboten werden.

2.2.2.2. Grüner Hundskopfschlinger (*Corallus caninus*)

Bei *Corallus caninus*, dem grünen Hundskopfschlinger oder der grünen Hundskopfboa, im Englischen „emerald tree boa“ genannt, handelt es sich um eine 1758 von LINNAEUS erstmals als *Boa canina* beschriebene Schlangenart. Taxonomisch lässt sich der grüne Hundskopfschlinger folgendermaßen einordnen:

- Ordnung: **Squamata**
 - Unterordnung: **Serpentes**
 - Überfamilie: **Boidea**
 - Familie: **Boidae**
 - Unterfamilie: **Boinae**
 - Gattung: ***Corallus***

Corallus caninus ist in Anhang II des Washingtoner Artenschutzabkommens und Anhang B der EU-Artenschutzverordnung gelistet. Es besteht Buchführungs- und Meldepflicht nach BArtSchV.

Das Verbreitungsgebiet des grünen Hundskopfschlingers erstreckt sich über die Regenwälder des Amazonasgebietes. Grüne Hundskopfschlinger können über 20 Jahre alt und bis zu 230 cm lang werden (Coborn, 1995).

Adulte Tiere haben eine grüne Grundfärbung mit unregelmäßig geformten weißen Flecken im Bereich des Rückens und an der Seite. Jungtiere schlüpfen mit einer rotbraunen oder gelben Grundfärbung und färben sich im Laufe mehrerer Häutungen langsam nach grün um (Henderson, 1993; O'Shea and Halliday, 2007).

Die grüne Hundskopfboa ist wie alle Vertreter der Unterfamilie Boinae vivipar. Weibliche Tiere gebären bis zu 20 Jungtiere (O'Shea and Halliday, 2007; Trutnau, 2002). Der grüne Hundskopfschlinger ist dämmerungs- bis nachtaktiv und ernährt sich hauptsächlich von Kleinsäugetern, frisst aber auch kleine Vögel, Echsen und Frösche (Trutnau, 2002).

Bei *Corallus caninus* handelt es sich um sehr anspruchsvolle, als aggressiv und empfindlich geltende Pfleglinge, was sie für den Terraristik-Einsteiger vollkommen ungeeignet macht.

Laut Gutachten über die Mindestanforderungen an die Haltung von Reptilien (Anonym, 1997) muss für zwei Schlangen dieser Art ein Terrarium, das

mindestens 0,75 mal die Körperlänge der Tiere in der Länge, die halbe Körperlänge in der Breite und 1,5 mal die Körperlänge in der Höhe misst, vorhanden sein. Außerdem benötigen die Tiere waagrechte stabile Äste und eine robuste Bepflanzung, auf der sie gefahrlos herumklettern können. Die Lufttemperatur sollte 26-28 °C mit einer lokalen Erwärmung auf 33-35 °C betragen. Die relative Luftfeuchte sollte bei 70-100 % liegen, was z. B. durch ein großes Badebecken in Kombination mit einer Regenanlage erreicht werden kann.

2.2.2.3. Tokeh (*Gekko gecko*)

Bei *Gekko gecko*, im Deutschen als Tokeh oder Tokee und im Englischen als Tokay gecko bezeichnet, handelt es sich um eine 1758 von LINNAEUS als *Lacerta gecko* beschriebene nachtaktive Geckoart. Taxonomisch lässt er sich aktuell wie folgt einordnen:

- Ordnung: **Squamata**
 - Unterordnung: **Lacertilia**
 - Teilordnung: **Gekkota**
 - Familie: **Gekkonidae**
 - Unterfamilie: **Gekkoninae**
 - Gattung: **Gekko**

Seinen Namen verdankt das Tier seinen charakteristischen Rufen, die wie „Tok-keh, Tok- keh“ klingen (Walls and Walls, 1999).

Der Tokeh gehört nicht zu den besonders geschützten Tierarten. Sein natürliches Verbreitungsgebiet liegt in den Regenwäldern großer Teile Südostasiens. Dort leben die Tiere in Spalten oder auf der Rinde von Bäumen (Romer, 1951).

Tokenhs erreichen eine Kopf-Rumpflänge von bis zu 20 cm, wobei die männlichen Tiere in der Regel größer sind als die weiblichen. Sie können über 20 Jahre alt werden (Walls and Walls, 1999).

Ihre Grundfärbung ist grau bis bläulich mit zahlreichen orangeroten Flecken (Brown et al., 2008).

Der Tokeh gehört zu den oviparen Reptilienarten. Weibliche Tiere kleben bis zu fünfmal im Jahr je zwei Eier an Gegenstände und bewachen das Gelege anschließend (Henkel and Schmidt, 2003; Walls and Walls, 1999).

Tokenhs sind insektivor, verschmähen jedoch auch kleine Nager und Säugetiere

nicht, sofern sie Zugriff darauf haben. Generell fressen Tokehs alle Futtertiere mit einer Körpergröße, die noch aufgenommen und zerbissen werden kann.

Laut Gutachten über die Mindestanforderungen an die Haltung für Reptilien muss für die Haltung eines Paares dieser Art ein Terrarium mit einer Mindestlänge und -breite von je des sechsfachen der Kopfrumpflänge (KRL) der Tiere und einer Höhe, die achtmal der KRL der Tiere entspricht, verwendet werden. Die Temperatur sollte 26-28 °C mit einer lokalen Erwärmung auf 35 °C betragen. Die relative Luftfeuchte sollte bei 60-80 % liegen. Außerdem müssen ein feuchtes Bodensubstrat wie z.B. Erde sowie Kletter- und Versteckmöglichkeiten angeboten werden (Walls and Walls, 1999).

Da Tokehs zu den Geckos mit Lamellenfüßen gehören, ist es ihnen möglich, sich auch an glatten Flächen und an senkrechten Wänden fortzubewegen (Bhushan, 2007). Dies sollte bei der Haltung dieser Tiere unbedingt beachtet werden.

3. Genotypische Charakterisierung von Hämogregarinen

3.1. PCR: Allgemeines und geschichtlicher Hintergrund

Bei der PCR (Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion) handelt es sich um ein molekularbiologisches Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Diese Methode wurde 1983 von Kary B. MULLIS entdeckt (Mullis, 1990). Im Jahr 1993 erhielt er dafür den Nobelpreis für Chemie. Zu Beginn wurde jeder einzelne Schritt der PCR vom Laborpersonal von Hand durchgeführt (Medlin et al., 1988; Mullis et al., 1986). Im Jahr 1988 wurden jedoch bereits die ersten automatischen Laborgeräte für die PCR beschrieben (Rollo et al., 1988). Seither meldeten verschiedene Firmen Patente auf unterschiedliche Thermocycler an (Atwood et al., 1995; Benett and Richards, 2003; Birrer and Moser, 1998; Tasch, 2008).

3.2. Prinzip

Als Ausgangspunkt für eine konventionelle PCR wird ein Reaktionsgemisch hergestellt, welches zu vervielfältigende DNA-Moleküle, dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate), spezifische Oligonukleotid-Moleküle, die sogenannten Primer, Reaktionspuffer sowie eine hitzestabile DNA-Polymerase enthält. Hierbei hat sich die aus dem Tiefseebakterium *Thermus aquaticus* stammende, sogenannte Taq-Polymerase bewährt (Chien et al., 1976; Innis et

al., 1988).

Die Polymerase-Kettenreaktion besteht aus drei Schritten (Schochetman et al., 1988). Im ersten Schritt wird das Reaktionsgemisch stark erhitzt (ca. 95°C). Dies führt zu einer Denaturierung der im Reaktionsansatz enthaltenen doppelsträngigen DNA.

Beim zweiten Schritt wird das Reaktionsgemisch für ca. 30 Sekunden auf ein von der DNA-Sequenz der verwendeten Primer abhängiges Temperaturoptimum gesenkt, bei dem sich die Primer an Bereiche der DNA-Einzelstränge anlagern können, die eine komplementäre Basensequenz besitzen (sogenannte Annealing-Phase).

Im dritten Schritt wird das Gemisch auf die optimale Arbeitstemperatur der verwendeten DNA-Polymerase erhitzt. Diese verlängert dann den DNA-Einzelstrang ausgehend vom angelagerten Primer von 5'- in 3'-Richtung unter Verwendung der im Reaktionsgemisch enthaltenen dNTPs zum DNA-Doppelstrang (Elongations-Phase).

Als Ergebnis werden im ersten PCR-Zyklus zwei identische Kopien der ursprünglich zugesetzten DNA-Probe erhalten. In den folgenden Zyklen erhöht sich die Anzahl der erhaltenen DNA-Kopien exponentiell.

In Abbildung 6 wird der Ablauf eines PCR-Zyklus schematisch dargestellt.

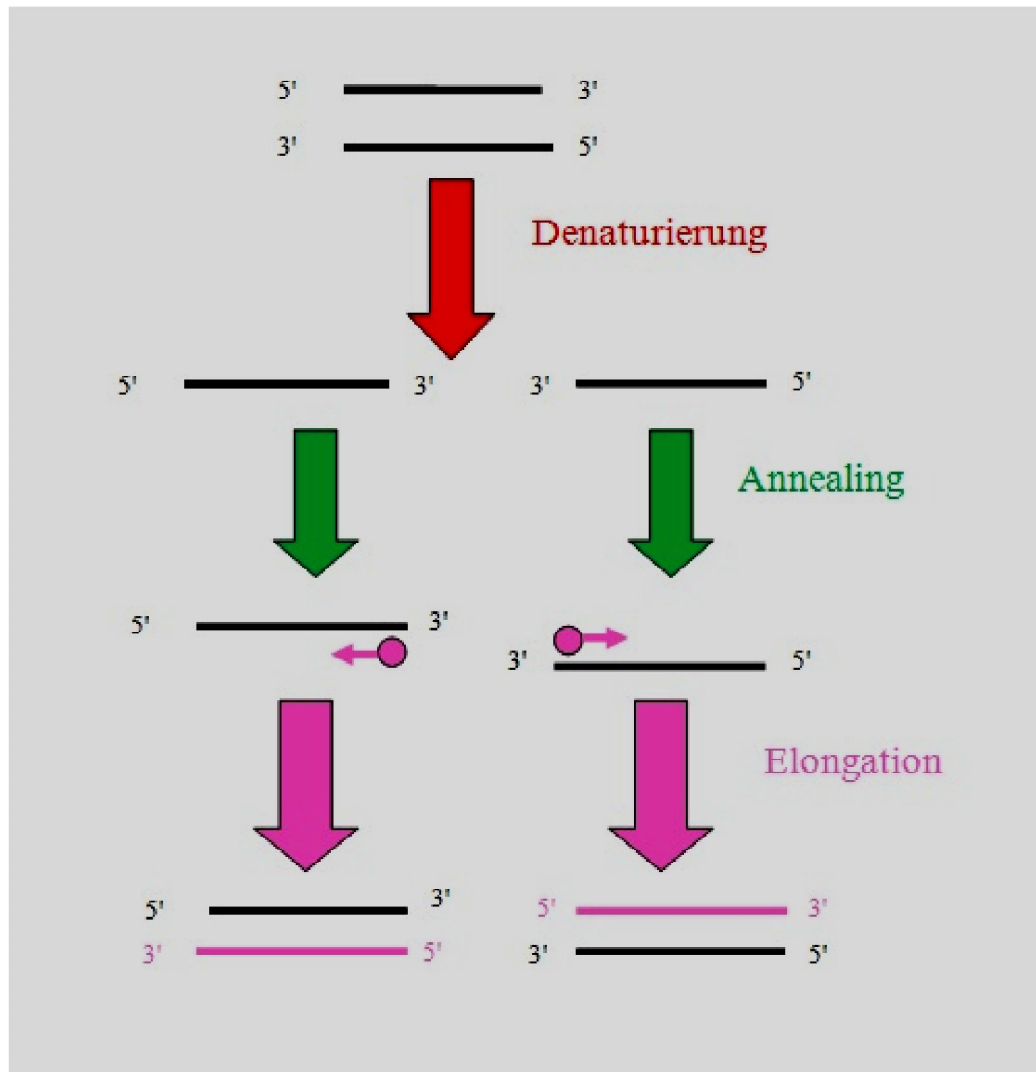


Abbildung 6: schematischer Ablauf eines Zyklus der Polymerase-Kettenreaktion

3.3. Anwendung der PCR bei Hämogregarinen

Erste Untersuchungen zum Nachweis und zur Charakterisierung von Hämogregarinen mittels PCR wurden im Jahr 1994 publiziert. Bereits 11 Jahre nach der Entdeckung der Polymerase-Kettenreaktion durch Mullis konstruierten WOZNIAK, TELFORD und McLAUGHLIN (1994) auf der Grundlage des 18S rRNA-Strukturgens von *Plasmodium* sp. und *Babesia* sp. die Primer 18AP853.F und 18AP1488.R und amplifizierten damit erfolgreich DNA von *Hepatozoon* sp. aus Blutproben von Königspythons (*Python regius*), Kettennattern (*Lampropeltis getulus*), Wassermokassinottern (*Agistrodon piscivorus*) und Seitenwinder-Klapperschlangen (*Crotalus cerastes*) (Wozniak et al., 1994). PERKINS und KELLER (2001) setzten für ihre Studie zur Phylogenetik verschiedener Hämogregarinen von Echsen die von WOZNIAK et al. (1994) entwickelten Primer

ein, stellten dabei allerdings fest, dass diese sowohl Hämogregarinen- als auch Wirts-DNA replizierten. Deshalb konstruierten sie auf Grundlage ihrer erhaltenen Hämogregarinen-Sequenzen die Hämogregarinen-spezifischen Primer HEMO1 und HEMO2, die das 18S rRNA-Gen amplifizieren (Perkins and Keller, 2001).

Auch die folgenden Studien zu Hämogregarinen bei Reptilien basierten bislang ausschließlich auf der Charakterisierung von rRNA-Gen-Abschnitten. UJVARI, MADSEN und OLSSON (2004) nutzten zunächst die beiden von LI et al. (1995) und von PERKINS et al. (1998) für Blutparasiten entwickelten Primerpaare, um Hepatozoon-DNA von australischen Wasserpythons (*Liasis fuscus*) zu amplifizieren. Da unter Verwendung dieser Primer jedoch nur ein ca. 180 bp langes DNA-Fragment, also nur eine sehr kurzes PCR-Produkt und die entsprechende Sequenz erhalten wurde, entwickelten sie ausgehend von verschiedenen *Hepatozoon* sp.-Sequenzen aus der NCBI-Genbank mit HepF300 und Hep900 ein neues Hämogregarinen-spezifisches Primerpaar, welches ebenfalls das 18S rRNA-Gen als Zielsequenz hat (Li et al., 1995; Perkins et al., 1998; Ujvari et al., 2004).

VILCINS, UJVARI, OLD und DEANE (2009) untersuchten u.a. mit Hilfe der PCR Zecken, die von verschiedenen Reptilien in Australien abgesammelt worden waren, auf den Befall mit *Hepatozoon*. Sie nutzen hierzu die von MATHEW et al. (2000) konstruierten und für *Hepatozoon* spezifischen Primer 4558F und 2773R sowie das von CRIADO-FORNELIO et al. (2006) entwickelte Primerpaar HAM-1F und HPF-2r (Criado-Fornelio et al., 2006; Mathew et al., 2000; Vilcins et al., 2009).

Seit 2009 wurden vermehrt Untersuchungen publiziert, die die oben erwähnten, in den Jahren zuvor für Reptilienhämogregarinen entwickelten Primer einsetzen. So wurden die Primer HEMO1 und HEMO2 und im Anschluss die Primer HepF300 und Hep900 zum Nachweis von *Hepatozoon* sp. bei Reptilien von den Seychellen (Harris et al., 2011), bei nordafrikanischen Echsen (Maia et al., 2011) und zum Nachweis von *Hemolivia*-Infektionen bei maurischen Landschildkröten (*Testudo graeca*) (Harris et al., 2013) verwendet.

Bei der Untersuchung von Blutproben von insgesamt 209 Schlangen von 40 verschiedenen Arten aus Afrika, Amerika und Asien, zunächst mikroskopisch und dann mittels PCR unter Verwendung des Primerpaar HEMO1 und HEMO2, auf den Befall mit *Hepatozoon* sp. ergab sich allerdings, dass nicht alle

mikroskopisch als positiv bewerteten Blutproben auch in der PCR ein positives Ergebnis erzielen. Jedoch waren zwei Proben in der PCR positiv, bei denen mittels mikroskopischer Untersuchung keine Gamonten in den Erythrozyten gefunden werden konnten (Haklová et al., 2013). In verschiedenen Studien, in denen durch eine PCR-Untersuchung eine höhere Prävalenz als durch mikroskopische Untersuchungen festgestellt wurde, wurden nicht alle in den PCRs erhaltenen Amplifikate sequenziert (Criado-Fornelio et al., 2007; Ujvari et al., 2004). HAKLOVÁ et al. (2013) zeigten jedoch, dass ein positives PCR-Ergebnis nicht beweisend für eine Infektion mit Hämogregarinen ist, da die von ihnen verwendeten Primer HEMO1 und HEMO2 fähig sind, auch andere Parasiten vom Stamm Apikomplexa, die nicht zu den Hämogregarinen eingeordnet werden, zu replizieren. Auch bei den von CRIADO-FORNELIO et al. (2007) und UJVARI et al. (2004) verwendeten Primern ist die Replikation von anderen Parasiten des Stammes Apikomplexa nicht ausgeschlossen.

Bei der Anwendung von PCR-Techniken zum Nachweis von Hämogregarinen bei Reptilien bestehen daher derzeit die Probleme, dass einerseits die aktuell in vielen Studien verwendeten Primer vermutlich nicht für alle Hämogregarinenarten geeignet sind und andererseits auch Nicht-Hämogregarinen-DNA amplifiziert wird. Beide Phänomene tragen sicherlich zu den aktuell häufig beschriebenen Diskrepanzen zwischen mikroskopischem und molekularbiologischem Nachweis bei und für die Bestätigung eines Hämogregarinenbefalls ist es erforderlich, dass alle mittels PCR erhaltenen Amplifikate sequenziert werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Untersuchte Tiere

Von Dezember 2010 bis Januar 2012 wurden bei zwei verschiedenen deutschen Großimporteuren Blutproben von kürzlich nach Deutschland importierten Reptilien gewonnen. Die Probenentnahme erfolgte in der Regel innerhalb der ersten vier Wochen nach Ankunft der Tiere in Deutschland. Bei den für diese Dissertation verwendeten Tieren handelte sich entweder um Wildfänge oder "geranchte" Tiere. "Gerancht" bedeutet, dass die trächtigen weiblichen Tiere im Ursprungsland eingefangen werden und dann in Gefangenschaft Eier legen oder Jungtiere gebären, welche dort aufgezogen werden. Die Elterntiere werden nach der Ablage der Eier oder der Geburt der Jungtiere wieder in die Freiheit entlassen.

Da für die geplanten Untersuchungen (Anfertigung von Blutaussstrichen, Bestimmung des Hämatokrits, DNA-Extraktion) eine Mindestblutmenge von 100 µl benötigt wurde und bei Reptilien die entnommene Blutmenge nicht mehr als 0,5 - 0,8 % der Körpermasse in Gramm betragen sollte (Girling and Raiti, 2004), wurden nur Reptilien mit einer Körpermasse von mehr als 25 g einbezogen und beprobt. Die mikroskopische Untersuchung von Blutproben von insgesamt 410 Reptilien ist Gegenstand einer parallel durchgeführten Dissertationsarbeit (Halla, 2015). Das Versuchsvorhaben wurde unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531.3-57-10 von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

Für die vorliegende Dissertation zur molekularbiologischen Charakterisierung von Hämogregarinen wurden Blutproben nur von denjenigen Reptilienspezies ausgewählt, bei denen in der Studie von HALLA (2015) Hämogregarinen lichtmikroskopisch nachgewiesen worden waren. HALLA (2015) wies bei 15 von 20 Königspythons (*Python regius*) und 8 von 16 Westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten (*Pelusios castaneus*), die alle aus Togo stammten, Hämogregarinen nach. Des Weiteren wurde in Blutproben von 24 von 26 grünen Hundskopfschlingern (*Corallus caninus*), und zwar einer aus Französisch Guyana und 25 aus Surinam, sowie bei einem von 25 Tokeehs (*Gekko gecko*) aus Vietnam lichtmikroskopisch ein Befall mit Hämogregarinen festgestellt (Halla, 2015). Für die vorliegende Dissertation wurde eine Gesamtzahl von insgesamt

48 Blutproben in die Untersuchungen einbezogen. Bei den Königspythons und den westafrikanischen Pelomedusen-Klappbrustschildkröten handelte es sich um "geranchte" Tiere, während die grünen Hundskopfschlinger und die Tokeehs Wildfänge waren.

1.1. Klinische Allgemeinuntersuchung

Vor der Blutprobenentnahme wurden die Tiere klinisch untersucht. Dazu wurden zunächst das Allgemeinbefinden und der Ernährungszustand beurteilt. Im Anschluss wurde die Körperoberfläche des Tieres auf Verletzungen, Verfärbungen, Umfangsvermehrungen und einen potentiellen Befall mit Ektoparasiten (Milben, Zecken, Egel) untersucht. Bei der Untersuchung von Gliedmaßen (Krallen) und Schwanz wurden auf Vollständigkeit, Veränderungen und ggf. Regeneratbildung geachtet. Außerdem wurden, sofern ohne großen Stress für den betreffenden Probanden möglich, die Maulschleimhäute beurteilt sowie alle Körperöffnungen auf Verfärbungen, Verletzungen und abnorme Sekretbildung untersucht. Bei der adspektorischen Untersuchung der Augen der Tiere wurde auf eventuelle Asymmetrien, Rötungen und Ausfluss geachtet. Während der Untersuchung wurden die Tiere vermessen und gewogen.

Die Abbildungen 7 - 10 zeigen einzelne Exemplare der verwendeten Tierarten bei der klinischen Untersuchung.



Abbildung 7: Westafrikanische Klappbrust-Pelomedusenschildkröte (*Pelusios castaneus*) bei der Untersuchung



Abbildung 8: Königspython (*Python regius*) mit arttypischem Abwehrverhalten bei der Untersuchung



Abbildung 9: Hundskopfschlinger (*Corallus caninus*) bei der Untersuchung



Abbildung 10: Tokeh (*Gekko gecko*) bei der Untersuchung

1.2. Blutentnahme

Vorbereitend für die Blutentnahme wurden 1 ml-Spritzen mit aufgesetzter 23 G- oder 21 G-Kanüle mit Heparin gespült. Das Blut wurde bei Echsen und Schlangen aus der Vena coccygealis ventralis und bei Schildkröten aus der Vena coccygealis dorsalis entnommen. Dabei wurde ein Volumen von 0,1 ml pro Tier bzw. maximal ein Volumen, das 0,8 % seiner Körpermasse entspricht, entnommen. Nach der Blutentnahme wurde das Blut in ein 1,3 ml Lithium-Heparinröhrchen (Sarstedt, Nürnberg, Deutschland) verbracht. Noch vor Ort beim Großhändler wurden Blutausstriche angefertigt sowie mittels Mikrozentrifuge (Compur M 1101, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und Mikrokapillarröhrchen der Hämatokrit bestimmt. Die Blutausstriche wurden bis zur Durchführung der Färbung im Labor staubfrei in Präparatekästen gelagert. Die vorhandene Restblutmenge wurde bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert.

2. Bearbeitung der Blutproben

2.1. Färbung der Blutausstriche

Die Blutausstriche wurden einem Protokoll von MUTSCHMANN (2010) folgend nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) gefärbt. Hierzu wurden die luftgetrockneten Blutausstriche zunächst mit May-Grünwald-Lösung (Merck Nr. 1.01424, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) vollständig bedeckt und die Lösung bei Raumtemperatur drei Minuten einwirken gelassen. Im Anschluss wurde die gleiche Menge Aqua dest. hinzugegeben, und die verdünnte Lösung wirkte nochmals 2 Minuten ein. Während der Einwirkzeit wurde eine Giemsa-Gebrauchslösung hergestellt. Hierzu wurde 1 ml Giemsa-Stammlösung (Merck Nr. 1.09204, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 10 ml Aqua dest. verdünnt. Der Objektträger wurde aus der May-Grünwald-Lösung entnommen und für 15 Minuten mit der Giemsa-Lösung gegengefärbt. Im Anschluss wurde der Objektträger aus der Färbelösung entnommen, mit VE-Wasser abgespült und luftgetrocknet.

2.2. Mikroskopische Auswertung

Mit einem Lichtmikroskop (Leitz Aristoplan, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden die gefärbten Blutausstriche bei 100facher und 400facher Vergrößerung durchgemustert und nach Hinweisen auf Befall mit Blutparasiten

(Hämogregarinen) gesucht. Die entdeckten Hämogregarinen wurden im Rahmen einer vorangegangenen Studie (Halla, 2015) fotografiert, vermessen und soweit möglich anhand morphologischer Kriterien basierend auf Beschreibungen im wissenschaftlichen Schrifttum eine Zuordnung der Parasiten meist bis zur Gattung durchgeführt. Anhand der Fotografien und Messungen (Halla, 2015) wurden die gefundenen Hämogregarinen-Stadien in verschiedene Morphotypen eingeteilt.

Bei den mikroskopisch als Hämogregarinen-positiv befundenen Blutproben wurden im Anschluss molekularbiologische Untersuchungen mittels PCR und Sequenzierungen, gefolgt von phylogenetischen Analysen durchgeführt mit dem Ziel, eine genauere taxonomische Zuordnung durchzuführen.

2.3. DNA-Extraktion

Die Extraktion der DNA aus den Blutproben wurde mittels „DNeasy Blood & Tissue Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl der vorher bei 4 °C im Kühlschrank gelagerten Blutproben zur Lyse der Zellen und Freisetzung der DNA mit 20 µl Proteinase K (>600 mAU/ml), 220 µl PBS (phosphate buffered saline) und 200 µl Puffer AL in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen gemischt.

Pro Durchgang wurde eine Extraktionskontrolle (Negativkontrolle) mitgeführt. In dieser wurde anstatt der 10 µl Blutprobe eine entsprechende Menge an PBS eingesetzt.

Die Extraktionsansätze wurden anschließen 10 Minuten bei 70 °C inkubiert. Im Anschluss wurden je 200 µl 96%iges Ethanol hinzugefügt. Nach kurzem Durchmischen wurden 600 µl von jedem Ansatz in je eine, mit einer DNA-bindenden Silika-Matrix ausgekleideten, „DNeasy spin column“ verbracht und diese bei 8000 rpm eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Säule in neues 2 ml Röhrchen umgesetzt und 500 µl eines Waschpuffers (AW 1) dazugegeben. Nach erneuter Zentrifugation für eine Minute bei 8000 rpm wurde abermals der Überstand verworfen, die Säule in eine neues 2 ml Röhrchen verbracht und 500 µl eines weiteren Waschpuffers (AW 2) dazu gegeben. Im Anschluss wurden die Röhrchen 3 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säulen in ein neues, steriles 1,5 ml Eppendorfröhrchen verbracht. Zum Lösen der DNA von der Silika-Matrix wurden 200 µl Puffer AE hinzugegeben, die Reaktionsansätze eine Minute bei

Zimmertemperatur inkubiert und anschließend nochmals eine Minute bei 8000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Säule entsorgt und die DNA-haltige Lösung bis zur Durchführung der PCR bei -20 °C eingefroren.

Zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen von Parasiten-DNA zwischen Blutproben verschiedener Wirtstierarten wurden an einem Tag jeweils nur Blutproben einer Reptilienspezies bearbeitet.

2.4. PCR

Die PCR wurde mit einem SensoQuest Labcycler (SensoQuest GmbH, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde eine DNA-Lösung von *Hepatozoon canis* aus einem Hund verwendet, die uns freundlicherweise von Frau PD Dr. Silaghi, Lehrstuhl für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie, Veterinärwissenschaftliches Zentrum der Tierärztlichen Fakultät der LMU München, zur Verfügung gestellt wurde.

2.4.1. Primer

Als Zielsequenz wurde das 18S rRNA-Gen ausgewählt. Zunächst wurden die von PERKINS und KELLER (2001) entwickelten Primer mit den Sequenzen HEMO 1 (5'-TAT TGG TTT TAA GAA CTA ATT TTA TGA TTG – 3') und HEMO2 (5' - CTC CTT TTA AGT GAT AAG GTT CAC – 3') genutzt. In einer weiteren PCR wurden die von UJVARI et al. (2004) publizierten Primer HepF300 (5'- GTT TCT GAC CTA TCA GCT TTC GAC G 3') und Hep900 (5'- C AAA TCT AAG AAT TTC ACC TCT GAC – 3') verwendet. Diese beiden Primer waren vor allem für die Amplifikation von DNA von *Hepatozoon* sp. entwickelt worden. Mit dem Ziel, in unserem Probenmaterial ein breiteres Erregerspektrum zu detektieren, wurde in einem dritten Schritt als Forward-Primer der von MEDLIN et al. (1988) auf Basis einer auch bei dem bakteriellen 16S rRNA-Gen konservierten Region entwickelte Primer A mod (5'- CCT GGT TGA TCC TGC CAG T - 3') eingesetzt. Zur Erhöhung der Spezifität für Apikomplexa-DNA wurde aber gleichzeitig der von WOZNIAK et al (1994) konstruierte reverse Primer 18AP1488:R (5'- CGG AAT TAA CCA GAC AAA TC – 3') verwendet (Wozniak et al., 1994).

2.4.2. Durchführung

Nach den Angaben von HARRIS et al. (2011) wurden für das ersten Primerpaar (HEMO1, HEMO2) je 25 µl Reaktionsansatz 2,5 µl 10x Puffer (mit 15 mM MgCl₂, Qiagen, Hilden, Deutschland), je 0,25 µl Primer HEMO1 und HEMO2 (je 50 µM),

0,2 µl dNTPs (je 25 mM, Peqlab, Erlangen, Deutschland), 2,25 µl MgCl₂ (25 mM, Qiagen, Hilden), 2,5 µl bovines Serumalbumin (BSA, 10 mg/ml, New England BioLab GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland), 14,425 µl Diethylcarbonat (DEPC)-Wasser und 0,125 µl HotStar-Taq Polymerase (5 U/µl, Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Jeweils 2,5 µl DNA-Lösung der entsprechenden Probe wurden hinzugegeben. Im Thermocycler wurde das Gemisch zunächst 15 Min auf 94 °C erhitzt, anschließend folgten 35 Zyklen mit einer 30sekündigen Denaturierungsphase bei 94 °C, gefolgt von einer 30sekündigen Annealingphase bei 48 °C und einer einminütigen Amplifikationsphase bei 72 °C. Am Ende folgte eine 10-minütige finale Amplifikationsphase bei 72 °C, danach wurde Reaktionsgemisch bis zur Entnahme aus dem Thermocycler auf 4 °C gekühlt.

Für das 2. Primerpaar (HepF300, Hep900) wurden wie bei HARRIS et al. (2011) angegeben je 25 µl Reaktionsansatz 2,5 µl 10x Puffer (mit 15 mM MgCl₂, Qiagen, Hilden, Deutschland) je 0,3 µl Primer HepF300 und Hep900 (je 50 µM), 0,125 µl dNTPs (je 25 mM, Peqlab, Erlangen, Deutschland), 2,5 µl BSA (10 mg/ml, New England BioLab GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland), 16,525 µl DEPC-Wasser und 0,25 µl HotStar-Taq Polymerase (5 U/µl, Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Nach Zugabe von 2,5 µl DNA-Lösung der entsprechenden Probe wurde der Reaktionsansatz in den Thermocycler verbracht. Zunächst wurde das Reaktionsgemisch für 15 Minuten auf 94 °C erhitzt. Danach folgten 35 Zyklen mit je einer 30sekündigen Denaturierungsphase bei 94 °C, einer 30sekündigen Annealingphase bei 61 °C und einer einminütigen Amplifikationsphase bei 72 °C. Beendet wurde die PCR mit einer 10 minütigen finalen Amplifikationsphase bei 72 °C. Im Anschluss wurde das Reaktionsgemisch bis zur Entnahme aus dem Thermocycler auf 4 °C abgekühlt.

Mit DNA-Lösungen der Proben, bei denen nach Durchführung von 35 Zyklen lediglich ein schwaches oder kein Amplifikat erzeugt wurde, wurde die PCR mit identischem Reaktionsansatz nochmals durchgeführt. Jedoch wurde die Anzahl der PCR-Zyklen auf 45 oder 50 erhöht.

Beim 3. Primerpaar (Mod A, 18AP1488R) wurde ein nach den Angaben von WOZNIAK et al. (1994) und MEDLIN et al. (1988) modifiziertes Pipettierschema angewandt. Dabei wurde je 25 µl Reaktionsansatz 2,5 µl 10x Puffer (mit 15 mM MgCl₂, Qiagen, Hilden, Deutschland), je 0,2 µl Primer A mod und 18AP1488:R (je

50 µM), 0,25 µl dNTPs (je 25 mM, Peqlab, Erlangen, Deutschland), 1 µl MgCl₂ (25 mM, Qiagen, Hilden, Deutschland), 18,225 µl DEPC-Wasser und 0,125 µl HotStar-Taq Polymerase (5 U/µl, Qiagen, Hilden, Deutschland) gemischt. Nachdem je 2,5 µl DNA der entsprechenden Probe zugegeben wurde, wurde der Reaktionsansatz in den Thermocycler verbracht. Dabei wurde das Gemisch nach den Angaben von WOZNIAK et al. (1994) initial für 15 Min auf 94 °C erhitzt. Dann folgten 35 Zyklen mit je einer 30sekündigen Denaturierungsphase bei 94 °C, gefolgt von einer 30sekündigen Annealingphase bei 55 °C und einer 1minütigen Amplifikationsphase bei 72 °C. Am Ende der PCR folgte eine finale Amplifikationsphase von 7 Minuten bei 72 °C. Im Anschluss wurde das Gemisch bis zur Entnahme aus dem Thermocycler auf 4 °C abgekühlt.

Auch hier wurde mit DNA-Lösungen der Proben, bei denen nach Durchführung von 35 Zyklen nur ein schwaches oder kein Amplifikat erzeugt wurde, die PCR mit identischem Reaktionsansatz, allerdings mit Erhöhung der Anzahl der PCR-Zyklen auf 45 nochmals durchgeführt.

2.5. Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde, in Abhängigkeit von der Größe der Amplifikate, in 1,5 oder 2 %igem Agarosegel (0,75 g oder 1 g Agarose pro 50 ml Gel) durchgeführt. Hierzu wurde die Agarose (Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland) in der entsprechenden Menge 1xTBE- Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer) 3 Min bei 600W in der Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden 1,3 µl Ethidiumbromid (0,1 µg/ml, Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland) zugegeben und durch kurzes Schwenken vermischt. Danach wurde die Flüssigkeit in einen Gelträger einer Elektrophoresekammer (PerfectBlue Gelsystem PeqLab, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) gegossen und die Kämme eingesetzt. Nach Auspolymerisation des Gels nach ca. 15 min wurde das Gel mit 1xTBE-Laufpuffer überschichtet und die Kämme aus der Gelkammer entfernt. Für den Gellauf wurden 10 µl jedes PCR-Reaktionsansatzes mit 2 µl eines 6x-Gelladepuffers (Carl Roth GmbH und Co KG, Karlsruhe, Deutschland) gemischt. Anschließend wurden die Geltaschen mit jeweils einem Volumen von 10 µl dieser Mischung befüllt. Pro Reihe jedes Gellaufs wurde zudem ein DNA-Größenstandard (1kb DNA ladder, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) mitgeführt. Anschließend wurde die Gelelektrophorese bei 100 W für eine Stunde durchgeführt. Dabei erfolgt eine

Trennung von vorhandener DNA entsprechend ihrer Ladung und Größe. PCR-Produkte erwarteter Größe, die sich aufgrund des Zusatzes des Ethidiumbromids im UV-Licht in einem Transilluminator (GelJet Imager 2000, Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland) als Banden darstellten, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und bis zur Sequenzierung bei -20 °C gelagert.

2.6. Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurde die DNA der entstandenen PCR-Produkte aus den ausgeschnittenen Gelstücken extrahiert. Hierfür wurde der QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Angaben des Herstellers verwendet. Im ersten Schritt wurde das Gewicht der Gelstücke bestimmt. Danach wurde nach der Formel $[(\text{Gewicht des Gels in mg}) \times 3] \times 1,5$ (da 1,5%iges Gel) die entsprechende Menge des im Kit enthaltenen Puffer QG in μl zum Gelstück in das Reaktionsgefäß gegeben. Im Anschluss wurden die Reaktionsgefäße ca. 10 Minuten bei 50 °C inkubiert, bis sich das Agarosegel komplett verflüssigt hatte. Dann wurde eine dem Gewicht des Gelstücks in mg entsprechende Menge an Isopropanol in μl hinzugefügt. Im Anschluss wurde das Gemisch in eine „QIAquick column“ pipettiert und bei 10000 rpm für eine Minute zentrifugiert. Die QIAquick column enthält eine Membran, die mit einer DNA-bindenden Silikamatrix beschichtet ist. Der Durchfluss wurde verworfen, 500 μl Puffer QG auf die Säule gegeben und das Ganze abermals für eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde abermals verworfen und 750 μl eines Waschpuffers (PE) hinzugefügt, gefolgt von einer einminütigen Zentrifugation bei 10000 rpm. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde die Säule nochmals eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert. Zum Schluss wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt, 35 μl Elutionspuffer auf die Säule gegeben, eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss eine Minute bei 10000 rpm zentrifugiert und somit die an die Säule gebundene DNA eluiert. Die DNA-haltige Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

Die Sequenzierung der PCR-Produkte nach SANGER erfolgte durch die Firma GATC Biotech (Köln, Deutschland). Dazu wurde die wie oben beschrieben aufgereinigte DNA zusammen mit dem PCR-Forward- oder Reverse-Primer, die als Sequenzierprimer benutzt wurden, verwendet.

2.7. Sequenzanalysen

Zunächst wurden die von der Firma GATC erhaltenen Sequenz-Daten mittels GATCViewer™ (<http://www.gatc-biotech.com/de/support/support/downloadlinks.html>) überprüft. Die erhaltenen Sequenzen wurden anschließend mittels BLAST-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) zunächst mit den bereits in der NCBI-Genbank vorhandenen Sequenzen verglichen. Im Anschluss wurden die Sequenzen mittels computergestütztem Alignment miteinander verglichen. Hierzu wurde die Software DNAMAN (Version 5.2.9.) der Firma Lynnon Corporation aus Quebec, Kanada verwendet.

Zunächst wurden die erhaltenen Sequenzen mittels „Pairwise Alignment“ untereinander verglichen. Als Methode wurde „Quick Alignment“ (Wilbur and Lipman, 1983) mit den Parametern „gap penalty“ von 7, „gap open“ von 10 und „gap extension“ von 5 ausgewählt. Basierend auf den dabei festgestellten Sequenzunterschieden wurden paarweise Identitäten ermittelt.

Im Anschluss daran wurde ein „Multiple Sequence Alignment“ unter Verwendung von Clustal W (Feng and Doolittle, 1987; Thompson et al., 1994) durchgeführt. Hierzu wurde als Methode „Full Alignment“ gewählt und ein „Dynamic Alignment“ mit den Parametern „Gap open penalty“ von 10, „Gap extension penalty“ von 5 und „Delay divergent sequences“ von 40 % durchgeführt.

Für das „Multiple Sequence Alignment“ wurden die erhaltenen Hämogregarinen-Sequenzen und bereits in der NCBI-Genbank vorhandene Hämogregarinensequenzen, sowie Sequenzen verschiedener Blutparasiten vom Stamm Apikomplexa einbezogen. Im Einzelnen waren dies: *Hepatozoon americanum* (AF176836), *Hepatozoon felis* aus einer Hauskatze (AY628681) und einem indischen Leoparden (HQ829443), *Hepatozoon canis* aus einem Wasserschwein (EF622096) und einem Hund (JN217102), *Hepatozoon sipedon* (JN181157), *Hepatozoon ayorgbor* (EF157822), *Hepatozoon catesbiana* (AF130361), *Hepatozoon domerguei* (KM234646), *Hepatozoon* sp. aus einem Mauergecko (HQ734806), einer maurischen Bachschildkröte (*Mauremys leprosa*) (KJ740753), einer Sandrennnatter (*Psammophis elegans*) (KC696568), einem Brillenkaiman (*Caiman crocodilus yacare*) (KJ413132), einer Klapperschlange (*Crotalus durissus terrificus*) (KC342526), einer Mauereidechse (HQ734793), sowie einer Wüstenspringmaus (KJ499535) und einer Beutelratte (FJ719813),

Haemogregarina balli aus einer Schnappschildkröte (HQ224959), *Haemogregarina* sp. aus einer dunklen Pelomeduse (*Pelusios subniger*) (KF257925), *Haemogregarina stephanovi* aus einer kaspischen Bachschildkröte (*Mauremys rivulata*) (KF257927), *Haemogregarina* syn. *Hepatozoon fitzimonsi* aus einer afrikanischen Schnabelbrustschildkröte (*Chersina angulata*) (KJ702453), *Hemolivia mariae* aus einer Tannenzapfenechse (*Tiliqua rugosa*) (JN211118), *Hemolivia mauritanica* aus einer maurischen Landschildkröte (KF992709) und einer Breitrandschildkröte (KF992710), *Karyolysus* sp. aus einer Waldeidechse (*Zootoca vivipara*) (KJ461946) und *Dactylosoma ranarum* aus einem Teichfrosch (HQ224958). Die eigenen Sequenzen wurden unter Auslassung der Primersequenzen analysiert. Für die Erstellung des Stammbaums wurden alle einbezogenen Sequenzen auf eine gemeinsame Länge von etwa 570 bp gekürzt.

Basierend auf den multiplen Alignments wurde ein phylogentischen Stammbaum erstellt. Hierfür wurde die Distanz-Matrix-Methode unter Verwendung einer Neighbour-Joining Methode (Saitou and Nei, 1987) sowie Bootstrapping nach Felsenstein (1985) mit 1000 Bootstraps angewendet.

IV. ERGEBNISSE

1. Klinische Allgemeinuntersuchung

Bei der klinischen Allgemeinuntersuchung aller einbezogenen Importreptilien fanden sich diverse Auffälligkeiten und zwar sowohl bei Tieren, bei denen Hämogregarinen nachgewiesen wurden, als auch bei Tieren, bei denen keine Hämogregarinen gefunden wurden. Einige der Tiere der letztgenannten Gruppe mit Veränderungen waren aber nicht frei von Blutparasiten, sondern mit anderen Arten infiziert (Halla, 2015).

Bei vier von insgesamt 20 Königspythons wurden Hautwunden festgestellt (Abb. 11). Häutungsreste wurden bei zwei Tieren, blasse Maulschleimhäute bei zwei Tieren, sowie eine beidseits eingetrübte Brille bei einem Tier dokumentiert. Außerdem waren neun Königspythons mit Schildzecken befallen (Abb. 11).

Von den 26 einbezogenen grünen Hundskopfschlingern wurden Häutungsreste bei sechs Tieren, großflächige Gewebstekrosen und hochgradige Stomatitis bei einem Tier (Abb. 12) sowie Narben bei fünf Tieren festgestellt. Ein Tier wies eine geringgradige Rotfärbung der Bauchschuppen und eine deutliche Schleimbildung im Bereich der Atemwege auf.

Bei den westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten wurden bei neun von insgesamt 16 Tieren Panzerläsionen dokumentiert (Abb. 13). Bei zwei Tieren waren fehlende Krallen (Abb. 13) und bei zwei Tieren Wunden im Bereich der Hintergliedmaßen auffällig.

Einer von 25 untersuchten Tokehs war stark exsikkotisch und wies eine Verletzung im Bereich des linken Unterkiefers auf. Weitere drei Tiere dieser Art besaßen Hautwunden, zwei Tiere zeigten Abszesse im Bereich des Kiefers (Abb. 14). Bei dem mit Hämogregarinen befallene Exemplar und zwei weitere Geckos fanden sich Umfangsvermehrungen im Bereich der Gliedmaßen (Abb. 14), zwei Tiere zeigten skoliotische Veränderungen im Bereich des Schwanzes und ein weiteres Tier besaß ein Schwanzregenerat.



Abbildung 11: Königspython (*Python regius*); links: Befall mit Schildzecken, rechts: Hautwunde



Abbildung 12: Grüner Hundskopfschlinger (*Corallus caninus*) mit hochgradiger Stomatitis



Abbildung 13: Westafrikanische Klappbrust-Pelumedusenschildkröte (*Pelusios castaneus*); links: fehlende Kralle, rechts: Panzerläsion



Abbildung 14: Tokay (*Gekko gecko*); links: Schwellung der Zehe, rechts Unterkieferabszess

2. Mikroskopischer Nachweis von Hämogregarinen im Blutausstrich

2.1. Nachweishäufigkeit

Wie in der Dissertation von HALLA (2015) detailliert dargestellt, wurden bei insgesamt 48 von 410 Reptilien bei lichtmikroskopischer Untersuchung von gefärbten Blutausstrichen intraerythrozytäre Gamonten von Hämogregarinen nachgewiesen. Dies entspricht einer Nachweishäufigkeit von 11 %.

Bei 15 von 20 aus Togo stammenden Königspythons (*Python regius*) wurden Hämogregarinenstadien im Blutausstrich nachgewiesen. Dies entspricht einer Prävalenz von 75% innerhalb dieser Art.

24 von 26 Hundskopfschlingern (*Corallus caninus*) wiesen im Blutausstrich Gamonten von Hämogregarinen auf. Dies entspricht einer Prävalenz von 92 %. Die Parasiten wurden bei 23 von 25 Hundskopfschlingern aus Surinam und bei dem einzigen Hundskopfschlinger aus Französisch-Guyana (Tier Nr. 191) festgestellt.

Bei 8 von 16 Westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten (*Pelusios castaneus*) aus Togo, also bei 50 % der einbezogenen Tiere, wurden Hämogregarinen im Blutausstrich festgestellt.

Mit nur einem positiven Tier von insgesamt 25 einbezogenen fand sich die niedrigste Prävalenz bei aus Vietnam stammenden Tokeehs (*Gekko gecko*). Dies entspricht einer Prävalenz von 4%.

HALLA (2015) untersuchte insgesamt 46 Schlangen, 36 Schildkröten und 328 Echsen. Somit ergibt sich eine Nachweishäufigkeit von Hämogregarinen von

84% bei den untersuchten Schlangen, 22% bei den untersuchten Schildkröten und 0,003% bei den untersuchten Echsen.

Betrachtet man nur die Reptilien-Arten, bei denen Hämogregarinen nachgewiesen wurden, ergibt sich eine Prävalenz von 55% der Tiere.

Tabelle 2 bietet eine Übersicht über die mittels mikroskopischer Untersuchungen (Halla, 2015) festgestellten Prävalenzen für Hämogregarinen.

Tabelle 2: Prävalenzen von Hämogregarinen auf der Basis von mikroskopischer Untersuchung von Blutaussstrichen

Tierart	untersuchte Tiere (n)	Tiere mit Hämogregarinen (n)	Prävalenz
<i>Python regius</i>	20	15	75 %
<i>Corallus caninus</i>	26	24	92 %
<i>Pelusios castaneus</i>	16	8	50 %
<i>Gekko gecko</i>	25	1	4 %
Gesamt	87	48	55 %

2.2. Morphologie der lichtmikroskopisch nachgewiesenen Parasiten

In einer parallel durchgeführten Dissertationsstudie (Halla, 2015) wurden die Blutproben mikroskopisch auf Blutparasitenbefall untersucht, die gefundenen Hämogregarinen-Stadien vermessen und je nach ihrer Form, also z.B., ob schmal-oval, breit-oval oder gebogen, unterschiedlichen Morphotypen, die in Abbildung 15 dargestellt sind, zugeordnet.

Je nach Grad der Parasitämie wurden je Reptil ein bis 20 intraerythrozytäre Erreger vermessen. Dabei wurde festgestellt, dass die in den Königspythons gefundenen Hämogregarinen zwischen 9,6 und 17, 5 µm lang und 2,4 und 5,2 µm breit waren und eine längliche Form aufwiesen. Hier lag nur ein Morphotyp mit gerader, schmal-länglicher Form vor. Die in den Proben aus den grünen Hundskopfschlingern gefundenen Hämogregarinen ließen sich zwei Morphotypen und zwar einer länglichen und einer plumpen Form zuordnen. Die Hämogregarinenstadien vom plumpen Morphotyp wiesen eine Länge von 8,3-15,8 µm und eine Breite von 2,4-6,2 µm auf, während die vom länglichen Morphotyp eine Länge von 8,7-18,7 µm und eine Breite von 1,4-4,9 µm

aufwiesen. Die Hämogregarinen aus den Klappbrust-Pelomedusenschildkröten ließen sich in drei Morphotypen unterscheiden, plump, länglich und länglich mit Knick (bananenförmig). Der plumpe Morphotyp wies eine Länge von 10,9-28,5 μm und eine Breite von 3,3-6,9 μm auf. Die Stadien vom länglichen Morphotyp waren 19,6-29,4 μm lang und 3,5-6,5 μm breit und die Stadien vom bananenförmigen Typ 20,8-33,4 μm lang und 3,1-6,8 μm breit. Die bei dem Tokeh gefundenen Hämogregarinen waren 27,7 - 37,3 μm lang und 5,4 - 9,5 μm breit. Damit waren die Hämogregarinen-Stadien, die im Tokeh gefunden wurden, im Vergleich zu den Hämogregarinen-Stadien aus den anderen Reptilien sehr groß. Ihre Form war teilweise gleichmäßig, teilweise war ein Ende deutlich dicker als das andere und wies einen Knick auf.

Bei manchen Reptilien wurden bis zu drei verschiedene Morphotypen gefunden. Diese unterschiedlichen Morphotypen kamen auch gleichzeitig in einem Individuum vor.

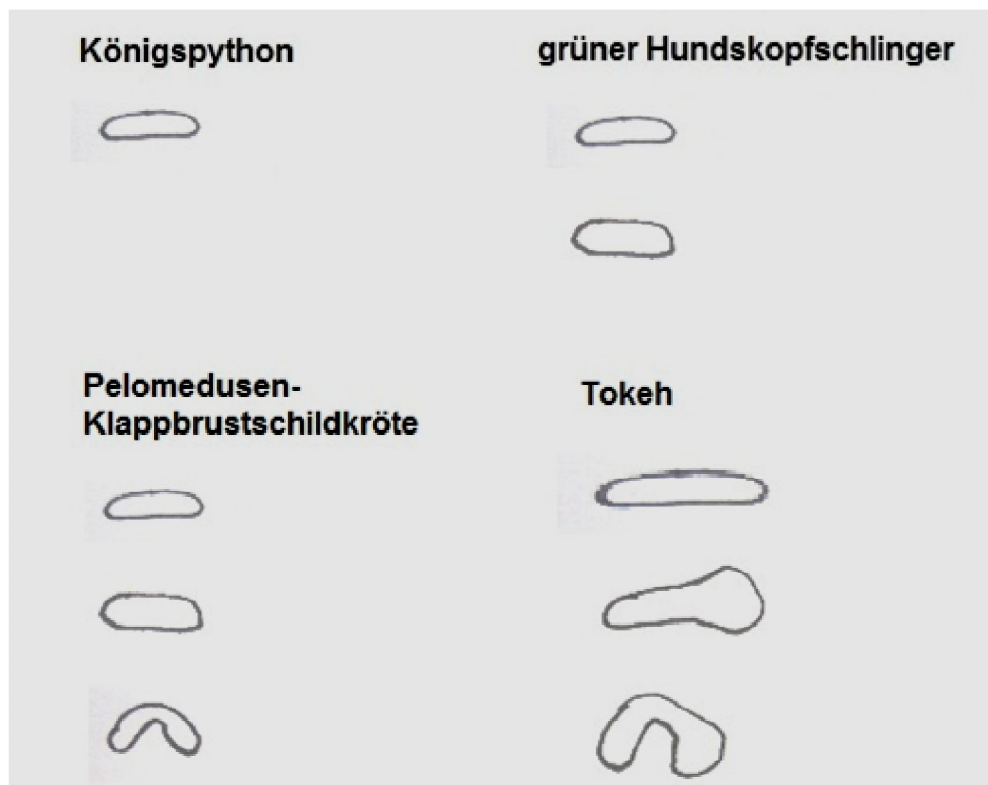


Abbildung 15: Schematische Übersicht der bei Hämogregarinen gefundenen Morphotypen

3. Genotypische Charakterisierung der Hämogregarinen

Blutproben von 44 der 48 Tiere mit im Blutausschlag nachgewiesenen Hämogregarinen wurden mittels PCR untersucht. Bei zwei Königspythons, einer westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröte und einem grünen Hundskopfschlinger waren im Anschluss an die morphologischen Untersuchungen keine ausreichende Restblutmengen mehr vorhanden, so dass diese Tiere nicht in die molekularbiologischen Studien einbezogen werden konnten.

3.1. Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit Primern nach Perkins und Keller (2001)

Bei Verwendung der PCR-Primer HEMO1 und HEMO2 (Perkins und Keller 2001) wurde ein ca. 1100 bp langes DNA-Fragment amplifiziert. Deutliche Banden waren bei Proben von einem Königpython und zwei grünen Hundskopfschlingern im Gel erkennbar. Zusätzlich entstanden bei zwei Königspythons und sechs grünen Hundskopfschlingern schwache Banden im Gel. Damit waren insgesamt nur 11 der 44 getesteten Proben in der PCR positiv, das heißt, hier entstanden PCR-Produkte der erwarteten Größe. Dies entspricht 25 % der untersuchten Proben.

In Abbildung 16 ist das Ergebnis einer Gelelektrophorese nach PCR mit Primer HEMO1 und HEMO2 beispielhaft dargestellt. Deutliche Banden sind bei Probe 1, 2, 5 und 7 erkennbar. Zusätzlich befindet sich eine schwache Bande bei Probe 3. Die Extraktionskontrolle (Negativkontrolle) ist negativ und bei der Positivkontrolle ist eine sehr deutliche Bande erkennbar.

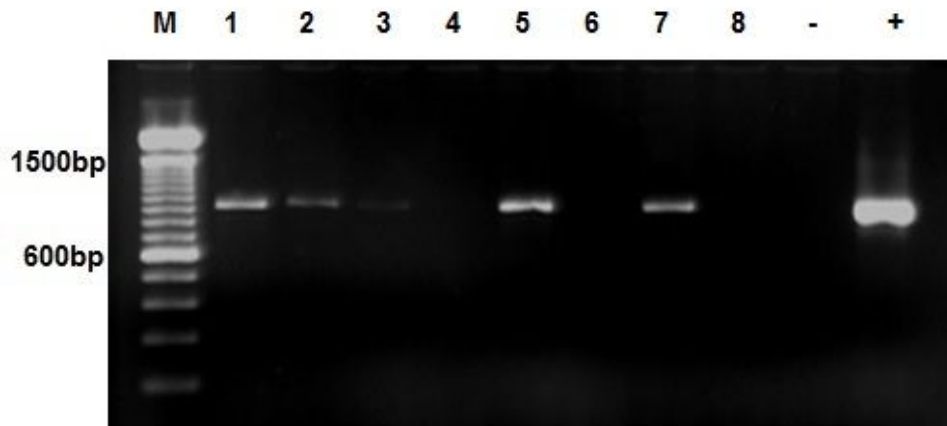


Abbildung 16: Gelelektrophorese nach PCR mit Primerpaar HEMO 1 und HEMO 2 (M, 100 bp-Größenstandard, 1-8 Proben aus verschiedenen grünen Hundskopfschlingern (Amplifikat bei 1, 2, 3, 5 und 7), -, Negativkontrolle, +, Positivkontrolle)

3.2. Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit Primern nach nach Ujvari et al. (2004)

Mit dem von UJVARI et al. (2004) entwickelten Primerpaar HepF300 und Hep900 entstanden ca. 650 bp lange DNA-Fragmente. Bei Proben aus vier Königspythons, 17 grünen Hundskopfschlingern und zwei Klappbrust-Pelomedusenschildkröten waren deutliche Banden im Gel erkennbar. Proben von weiteren drei Königspythons und drei grünen Hundskopfschlingern führten zu schwachen Banden im Gel. Somit waren 29 der 44 getesteten Proben in der PCR positiv. Dies entspricht 66% der Proben.

In Abbildung 17 ist das Ergebnis einer Gelelektrophorese mit dem Primerpaar HepF300 und Hep900 dargestellt. Bei Proben 1 - 6 sind deutliche Banden erkennbar. Die Extraktionskontrolle (Negativkontrolle) und Probe 7 sind negativ. Bei der Positivkontrolle zeigt sich eine sehr deutliche Bande.

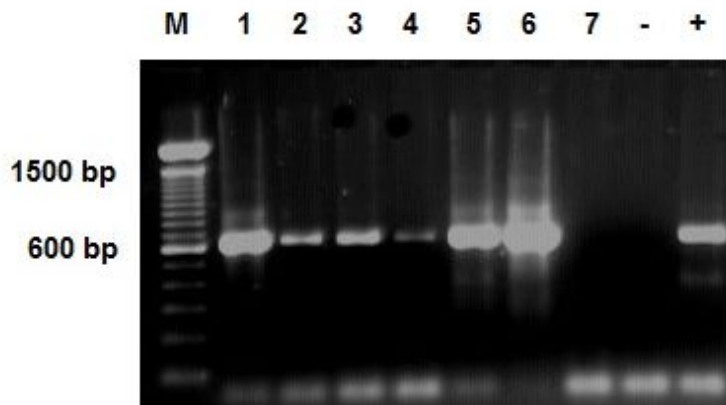


Abbildung 17: Gelelektrophorese nach PCR mit Primerpaar HepF300 und Hep900 (M, 100 bp-Größenstandard, 1-7 Proben aus verschiedenen grünen Hundskopfschlingern und einem Tokeh (7) (Amplifikat bei 1, 2, 3, 4, 5 und 6), -, Negativkontrolle, +, Positivkontrolle)

3.3. Ergebnisse der PCR-Untersuchungen mit Primern nach Medlin et al. (1988) und Wozniak et al. (1994)

Als drittes Primerpaar wurde der von MEDLIN et al. (1988) entwickelte forward-Primer A mod und der von WOZNIAK et al. (1994) konstruierte reverse Primer 18AP1488:R verwendet. Die PCR mit diesem Primerpaar führte zu PCR-Produkten von ca. 1200 bp Länge. Deutliche Banden entstanden bei Proben von zwei Königspythons, 10 Hundskopfschlingern und zwei Klappbrust-Pelomedusenschildkröten. Bei Proben von weiteren vier Königspythons und fünf grünen Hundskopfschlingern waren schwache Banden im Gel erkennbar. Damit waren 23 der 44 untersuchten Proben positiv. Dies entspricht 52% der untersuchten Proben.

Abbildung 18 zeigt das Ergebnis einer Gelelektrophorese mit dem Primerpaar A mod und 18AP1488.R. Es sind deutliche Banden bei den Proben 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9 erkennbar. Die Extraktionskontrolle (Negativkontrolle) ist genau wie Probe 2 negativ. Bei der Positivkontrolle ist eine deutliche Bande in der erwarteten Größe von 1200 bp erkennbar.

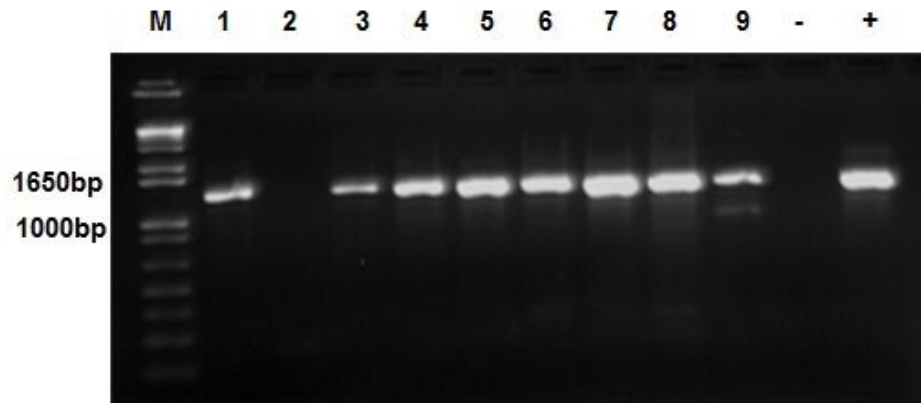


Abbildung 18: Gelelektrophorese nach PCR mit Primerpaar A mod und 18AP1488.R (M, 1 kb-Größenstandard, 1-9 Proben aus verschiedenen grünen Hundskopfschlingern (Amplifikat bei 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 und 9), -, Negativkontrolle, +, Positivkontrolle)

4. Ergebnisse der Sequenzierung

Für die Sequenzierung wurden nur PCR-Produkte ausgewählt, bei denen im Agarosegel eine deutliche Bande sichtbar war.

Bei einem mit dem Primerpaar HEMO1 und HEMO2 erzeugten PCR-Amplifikat aus einem Königspython und einem grünen Hundskopfschlinger, sowie einem mit dem Primerpaar HepF300 und Hep900 erzeugten Amplifikat aus einem weiteren grünen Hundskopfschlinger, konnten lediglich Mischsequenzen erhalten werden, d.h. diese Tiere waren vermutlich mit verschiedenen Hämogregarinen-Arten infiziert. Die aus diesen drei Amplifikaten erhaltenen Sequenzen wurden für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Von je einem Amplifikat aus einem Königspython (Nr. 51) und einem grünen Hundskopfschlinger (Nr. 398) wurden aus Amplifikaten mit den Primern HepF300 und Hep900 kurze Sequenzen erhalten. Aufgrund ihrer Kürze wurden sie jedoch ebenfalls nicht in die weiteren Analysen miteinbezogen.

Auswertbare Sequenzen wurden von PCR-Amplifikaten von 27 Tieren ermittelt (fünf Königspythons, 19 grüne Hundskopfschlinger und drei Klappbrust-Pelomedusenschildkröten).

Alle acht Sequenzen, die mit dem Primerpaar A mod und 18AP1488R (Medlin et al., 1988; Wozniak et al., 1994) aus PCR-Produkten sowohl von grünen Hundskopfschlingern (*Corallus caninus*) als auch von Königspythons (*Python*

regius) und Pelomedusenschildkröten (*Pelusios castaneus*) erhalten wurden, stellten sich bei Vergleichen mit den in der Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) vorhandenen Sequenzen als Reptilien-Genom-Sequenzen heraus und wurden deshalb in die weiteren Analysen nicht mit einbezogen.

Da mit dem von Perkins und Keller (2001) entwickelten Primerpaar HEMO 1 und HEMO 2 lediglich eine auswertbare Sequenz erhalten wurde, wurde diese mangels Vergleichbarkeit ebenfalls für die weiteren Analysen nicht berücksichtigt..

Somit ergab sich eine Gesamtzahl von 19 Sequenzen aus Amplifikaten mit HepF300/Hep900, die in die weiteren Analysen einbezogen wurden.

Tabelle 3 bietet einen Überblick darüber, aus welchen Reptilien Amplifikate und Sequenzen gewonnen werden konnten.

Tabelle 3: Übersicht über Ergebnisse der PCRs und erhaltene Sequenzen (+, starke Bande, (+), schwache Bande, - keine sichtbare Bande im Gel)

N.r	Tierart	HEMO1/ HEMO2	HepF300/ Hep900	A mod/ 18AP1488R
51	<i>P. regius</i>	-	kurze Sequenz	(+)
52	<i>P. regius</i>	(+)	Sequenz	-
54	<i>P. regius</i>	-	-	-
55	<i>P. regius</i>	-	Sequenz	-
56	<i>P. regius</i>	-	(+)	-
57	<i>P. regius</i>	-	(+)	-
59	<i>P. regius</i>	-	-	-
61	<i>P. regius</i>	-	-	Sequenz
62	<i>P. regius</i>	-	-	(+)
63	<i>P. regius</i>	-	-	Sequenz
64	<i>P. regius</i>	-	-	-

65	<i>P. regius</i>	(+)	(+)	(+)
66	<i>P. regius</i>	Mischsequenz	Sequenz	(+)
103	<i>C. caninus</i>	(+)	Sequenz	-
104	<i>C. caninus</i>	(+)	Sequenz	+
191	<i>C. caninus</i>	(+)	Sequenz	-
193	<i>C. caninus</i>	-	-	-
194	<i>C. caninus</i>	Mischsequenz	Sequenz	(+)
195	<i>C. caninus</i>	-	Sequenz	(+)
196	<i>C. caninus</i>	(+)	Sequenz	+
197	<i>C. caninus</i>	-	-	-
198	<i>C. caninus</i>	-	Sequenz	+
199	<i>C. caninus</i>	-	-	-
200	<i>C. caninus</i>	-	Sequenz	+
201	<i>C. caninus</i>	-	(+)	Sequenz
202	<i>C. caninus</i>	-	Mischsequenz	Sequenz
203	<i>C. caninus</i>	-	-	Sequenz
204	<i>C. caninus</i>	-	-	Sequenz
205	<i>C. caninus</i>	-	Sequenz	+
232	<i>C. caninus</i>	-	Sequenz	+
366	<i>P. castaneus</i>	-	-	-
369	<i>P. castaneus</i>	-	-	-
370	<i>P. castaneus</i>	-	-	-
371	<i>P. castaneus</i>	-	-	Sequenz
373	<i>P. castaneus</i>	-	Sequenz	Sequenz
374	<i>P. castaneus</i>	-	-	-

376	<i>P. castaneus</i>	-	Sequenz	-
395	<i>C. caninus</i>	Sequenz	(+)	-
396	<i>C. caninus</i>	-	Sequenz	(+)
397	<i>C. caninus</i>	-	Sequenz	-
398	<i>C. caninus</i>	-	kurze Sequenz	-
400	<i>C. caninus</i>	(+)	Sequenz	(+)
401	<i>C. caninus</i>	(+)	Sequenz	(+)
407	<i>G. gecko</i>	-	-	-

5. Ergebnisse der Sequenzanalysen

5.1. Paarweises Alignment

Zunächst wurden die 19 erhaltenen Sequenzen (zwei Sequenzen aus westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten, drei Sequenzen aus Königspythons und 14 Sequenzen aus grünen Hundskopfschlingern) mit Hilfe der Software DNAMAN mittels „Pairwise Alignment“ untereinander verglichen. Als Methode wurde „Quick Alignment“ (Wilbur and Lipman, 1983) mit den Parametern „gap penalty“ von 7, „gap open“ von 10 und „gap extension“ von 5 ausgewählt.

Dabei zeigte sich, dass die beiden Sequenzen aus den westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten (*Pelusios castaneus*) mit einer Übereinstimmung von 91,2 % deutliche Unterschiede aufwiesen. Es wurden also zwei verschiedene Haplotypen nachgewiesen.

Die drei Sequenzen aus den Königspythons (*Python regius*) unterschieden sich von allen anderen Sequenzen und mit einer maximalen Übereinstimmung von 98,9 % auch untereinander. Bei den drei Sequenzen handelte es sich um drei verschiedene Haplotypen.

Aus den grünen Hundskopfschlingern (*Corallus caninus*) wurden 14 Sequenzen analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Sequenzen aus fünf Tieren (Nr. 401, 104, 191, 196 und 205) zu 100 % identisch waren. In dieser Gruppe fand sich auch die Sequenz der Blutparasiten des einzigen grünen Hundkopfschlingers Nr 191

aus Französisch Guyana. Außerdem stimmten zwei weitere Sequenzen (aus Nr. 232 und. 400) vollständig überein. Die restlichen sieben Sequenzen unterschieden sich jeweils in einzelnen Basen, so dass die ermittelten paarweisen Identitäten zwischen 95,8 % und 100 % variierten. Bei den Parasiten aus den grünen Hundskopfschlingern wurden also 9 Haplotypen festgestellt.

Insgesamt wurden in der vorliegenden Untersuchung somit zwei Haplotypen der partiellen 18S rDNA der Blutparasiten aus den westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten und drei Haplotypen aus den Königspythons erhalten. Insgesamt neun Haplotypen wurden bei den grünen Hundskopfschlingern nachgewiesen.

In Tabelle 4 sind die Ergebnisse des paarweisen Alignments dargestellt.

Tabelle 4: Übersicht über die Ergebnisse des paarweisen Alignments der erhaltenen Sequenzen; Identität der Sequenzen in Prozent

	373 P.C.	376 P.C.	52 P.R.	55 P.R.	66 P.R.	103 C.C.	104 C.C.	191 C.C.	194 C.C.	195 C.C.
373 P.C.		91,2	89,5	89,4	93,2	92,5	94,6	94,7	92,5	94,1
376 P.C.	91,2		89,3	91,0	89,2	94,0	92,0	92,0	91,7	94,7
52 P.R.	89,5	89,3		95,5	98,9	93,0	92,9	92,5	92,3	96,2
55 P.R.	89,4	91,4	95,5		95,0	93,1	92,9	92,9	94,2	96,2
66 P.R.	93,2	89,2	98,9	95,0		91,3	92,6	91,9	98,6	96,5
103 C.C.	92,5	94,0	93,0	93,1	91,3		96,3	96,4	96,5	97,9
104 C.C.	94,6	92,0	93,5	92,9	92,6	96,3		100	96,5	96,2
191 C.C.	94,7	92,0	92,5	92,9	91,9	96,4	100		96,4	97,9
194 C.C.	92,5	91,7	92,3	94,2	92,9	98,6	96,5	96,4		97,9
195 C.C.	94,1	94,7	96,2	93,6	96,5	96,2	97,9	96,2	96,4	
196 C.C.	94,7	92,5	93,9	92,9	91,9	96,4	100	100	96,4	97,9
198 C.C.	94,5	92,3	92,2	92,9	97,2	96,0	99,8	99,6	96,7	97,9
200 C.C.	94,2	92,7	92,5	92,9	93,6	95,8	99,8	99,5	96,7	97,9
205 C.C.	94,7	94,4	92,5	92,9	93,3	96,4	100	100	96,4	97,9
232 C.C.	94,5	95,5	92,7	93,1	93,6	96,6	99,8	99,8	96,6	97,9
396 C.C.	91,8	92,7	92,0	93,4	90,8	99,2	95,8	95,8	98,5	96,4
397 C.C.	94,1	93,3	93,8	93,1	92,9	95,9	99,5	99,5	97,0	97,9
400 C.C.	94,5	92,5	94,1	93,1	92,0	96,6	99,8	99,8	96,9	97,9
401 C.C.	94,7	95,0	94,1	92,9	93,8	96,4	100	100	96,4	97,9

196 C.C.	198 C.C.	200 C.C.	205 C.C.	232 C.C.	396 C.C.	397 C.C.	400 C.C.	401 C.C.	
94,7	94,5	94,4	94,7	94,5	91,8	94,1	94,5	94,7	373 P.C.
92,5	92,3	92,7	94,4	95,5	92,7	93,3	92,5	95,0	376 P.C.
93,9	92,2	92,5	92,5	92,7	92,0	93,8	94,1	94,1	52 P.R.
92,9	92,9	92,9	92,9	93,1	93,4	93,1	93,1	92,9	55 P.R.
91,9	97,2	93,6	93,3	93,6	90,8	92,9	92,0	93,8	66 P.R.
96,4	96,0	95,8	96,4	96,6	99,2	95,9	96,6	96,4	103 C.C.
100	99,8	99,8	100	99,8	95,8	99,3	99,8	100	104 C.C.
100	99,6	99,5	100	99,8	95,8	99,5	99,8	100	191 C.C.
96,4	96,7	96,7	96,4	96,6	97,0	96,7	96,9	96,4	194 C.C.
97,9	97,9	97,9	97,9	97,9	97,9	97,9	97,9	97,9	195 C.C.
	99,6	99,5	100	99,8	95,8	99,3	99,8	100	196 C.C.
99,6		99,3	99,8	99,6	96,2	99,6	99,6	99,8	198 C.C.
99,5	99,3		99,5	99,3	95,8	99,3	99,3	99,5	200 C.C.
100	99,8	99,5		99,8	95,8	99,6	99,8	100	205 C.C.
99,8	99,6	99,3	99,8		96,0	99,5	100	99,8	232 C.C.
95,8	96,2	95,8	95,8	96,0		96,6	96,0	96,0	396 C.C.
99,3	99,6	99,3	99,6	99,5	96,6		99,5	99,6	397 C.C.
99,8	99,6	99,3	99,8	100	96,0	99,5		99,8	400 C.C.
100	99,8	99,5	100	99,8	96,0	99,6	99,8		401 C.C.

Legende:
P.R. = *Python regius*;
P.C. = *Pelusios castaneus*;
C.C. = *Corallus caninus*

5.2. BLAST-Analyse

Mittels BLAST-Analyse wurden die in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Sequenzen mit in der NCBI-Genbank verfügbaren Sequenzen verglichen. Dabei ergab sich bei allen 14 mit dem Primerpaar HepF300 und Hep900 (Ujvari et al., 2004) und einem mit dem Primerpaar HEMO1 und HEMO2 (Perkins and Keller, 2001) erhaltenen Haplotypen stets die höchste Identität mit als *Hepatozoon* sp. bezeichneten Erregern.

Die aus dem Königspython Nr. 66 erhaltene Sequenz war zu 100% mit einer in der Genbank vorhandenen Sequenz (KC696568) eines als *Hepatozoon* sp. bezeichneten Erregers aus einer Sandrennnatter (*Psammophis elegans*) aus Mali (Tomé et al. 2013) identisch. Alle anderen erhaltenen Sequenzen wiesen keine 100%ige Übereinstimmung mit einer bereits in der Genbank vorhandenen Sequenz auf. Es handelt sich also bei den restlichen in der Untersuchung von HALLA (2015) und hier nachgewiesenen Hämogregarinen um erstmalige molekularbiologische Charakterisierungen.

Die Sequenzen, die von den Hämoparasiten aus den Blutproben von Königspython Nr. 52 und 55 erhalten wurden, wiesen eine hohe Identität von 96-99 % mit mehreren in der Gendatenbank vorhandenen *Hepatozoon* sp. -Sequenzen auf, und zwar hauptsächlich von Blutparasiten aus verschiedenen Schlangenarten. Mit der Sequenz von *Hepatozoon ayorgbor*, einer bei Königspythons beschriebenen Hämogregarinenart, stimmten die Sequenzen ebenfalls zu einem hohen Prozentsatz von 99 bzw. 96 % überein (Tabelle 5).

Die Sequenzen aus den Klappbrust-Pelomedusenschildkröten (Nr.373 und 376) wiesen hohe Identitäten von 97-98 % mit als *Hepatozoon* sp. bezeichneten Sequenzen aus maurischen Bachschildkröten (*Mauremys leprosa*) auf. Eine Übereinstimmungen von 94 bzw. 95% fanden sich mit *Hemolivia mauritanica* aus einer maurischen Landschildkröte, *Haemogregarina stephanovi* aus der europäischen Sumpfschildkröte (*Emys orbicularis*), sowie anderen aus *Pelusios* sp. stammenden, in der Genbank als *Haemogregarina* sp. bezeichneten Sequenzen (Tabelle 5).

Die Sequenzen aus den grünen Hundskopfschlingern wiesen eine hohe Übereinstimmung mit *Hepatozoon* sp. -Sequenzen aus diversen Echsen und Schlangen auf. Außerdem waren sie zu einem hohen Prozentsatz mit der *Hepatozoon* sp. - Sequenz aus einer Chiloé-Beutelratte (*Dromiciops gliroides*)

identisch.

Die Sequenzen die durch das Primerpaar A mod und 18AP1488.R (Medlin et al., 1988; Wozniak et al., 1994) aus *P. regius*, *C. caninus* und *P. castaneus* erhalten wurden wiesen hohe Übereinstimmungen mit Genom-Sequenzen von diversen Reptilienspezies auf. Dies führt zu der Annahme, dass mit diesem Primerpaar Wirts-DNA repliziert wurde.

Eine aus einem Königspython (Nr. 51) mit dem Primerpaar HepF300 und Hep900 erhaltene kurze Sequenz wies hohe Übereinstimmungen mit in der Gendatenbank vorhandenen Sequenzen von Pilzen und Algen auf. Demnach kann mit diesem Primerpaar neben Hämogregarinen- auch Pilz- und Algen-DNA amplifiziert werden.

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse der BLAST-Analyse der erhaltenen Parasitensequenzen dargestellt. Dabei sind jeweils Sequenzen mit der höchsten Identität und deren Wirbeltierwirt genannt.

Tabelle 5: Übersicht der Ergebnisse der BLAST-Analyse

Sequenz, Reptilienwirtsspezies	Identität (%)	Genbank- Identifikationsnr.	Spezies (ex Wirbeltierwirt)
66 <i>P. regius</i>	100	KC696568	<i>Hepatozoon</i> sp. (Sandrennnatter)
52 <i>P. regius</i>	99	KC696568	<i>Hepatozoon</i> sp. (Sandrennnatter)
	99	KC696569	<i>Hepatozoon</i> sp. (Forskals Sandrennnatter)
	99	HQ734790	<i>Hepatozoon</i> sp. (Fächerfingergecko)
	99	EF157822	<i>Hepatozoon ayorgbor</i> (Königspython)
	99	KJ499535	<i>Hepatozoon</i> sp. (kl. Wüstenspringmaus)
55 <i>P. regius</i>	96	KJ408523	<i>Hepatozoon</i> sp. (Kapuzennatter)

	96	KJ408511	<i>Hepatozoon</i> sp. (Wüsten-Hornviper)
	96	KF939628	<i>Hepatozoon</i> sp. (Königskletternatter)
	96	KF524358	<i>Hepatozoon</i> sp. (Königskobra)
	96	EF157822	<i>Hepatozoon ayorgbor</i> (Königspython)
373 <i>P. castaneus</i>	97	KJ740753	<i>Hepatozoon</i> sp. (maurische Bachschildkröte)
	94	AB771567	<i>Hepatozoon felis</i> (Bengalkatze)
	94	KF257928	<i>Haemogregarina</i> <i>stephanovi</i> (europäische Sumpfschildkröte)
	94	KF257925	<i>Haemogregarina</i> sp. (dunkle Pelomeduse)
	94	KF257923	<i>Haemogregarina</i> sp. (Williams`mud turtle)
	94	KF992709	<i>Hemolivia mauritanica</i> (maurische LSK)
376 <i>P. castaneus</i>	98	KJ740753	<i>Hepatozoon</i> sp. (maurische Bachschildkröte)
	97	KJ740754	<i>Hepatozoon</i> sp. (maurische Bachschildkröte)
	96	KF257925	<i>Haemogregarina</i> sp. (dunkle Pelomeduse)
	95	KF257928	<i>Haemogregarina</i> <i>stephanovi</i> (europäische Sumpfschildkröte)

	95	KF992709	<i>Hemolivia mauritanica</i> (maurische LSK)
103 <i>C. caninus</i>	98	KM234615	<i>Hepatozoon</i> sp. (Halbfingergecko)
	97	KM234646	<i>Hepatozoon domerguei</i> (Malagasy cat-eyed snake)
	97	HQ734806 HQ734787 HQ734788	<i>Hepatozoon</i> sp. (Mauergecko)
104 <i>C. caninus</i> 191 <i>C. caninus</i> 196 <i>C. caninus</i> 205 <i>C. caninus</i> 401 <i>C. caninus</i>	98	FJ719813	<i>Hepatozoon</i> sp. (Chiloé-Beutelratte)
	97	HQ734806	<i>Hepatozoon</i> sp. (Mauergecko)
	97	KC696568	<i>Hepatozoon</i> sp. (Sandrennnatter)
	97	KC696567	<i>Hepatozoon</i> sp. (Sandrennnatter)
	97	KF524358	<i>Hepatozoon</i> sp. (Königskobra)
194 <i>C. caninus</i>	98	EF157822	<i>Hepatozoon ayorgbor</i> (Königspython)
	98	KJ413132	<i>Hepatozoon</i> sp. (Brillenkaiman)
195 <i>C. caninus</i>	98	KJ408520	<i>Hepatozoon</i> sp. (gelbgrüne Zornnatter)
	98	KJ408516	<i>Hepatozoon</i> sp. (gelbgrüne Zornnatter)
	98	KJ408513	<i>Hepatozoon</i> sp. (Balkan-Springnatter)
	97	KC342526	<i>Hepatozoon</i> sp. (Schauer-Klapperschlange)
	97	KC342525	<i>Hepatozoon</i> sp. (Schauer-

			Klapperschlange)
198 <i>C. caninus</i>	98	KM234613	<i>Hepatozoon</i> sp. (brasilianischer Gecko)
	97	FJ719813	<i>Hepatozoon</i> sp (Chiloé-Beutelratte)
	97	KF524358	<i>Hepatozoon</i> sp. (Königskobra)
200 <i>C. caninus</i>	98	FJ719813	<i>Hepatozoon</i> sp (Chiloé-Beutelratte)
	97	EF157822	<i>Hepatozoon ayorgbor</i> (Königspython)
	97	KF992710	<i>Hemolivia mauritanica</i> (Breitrandschildkröte)
232 <i>C. caninus</i> 400 <i>C. caninus</i>	98	HQ734806	<i>Hepatozoon</i> sp. (Mauergecko)
	97	KC696569	<i>Hepatozoon</i> sp. (Sandrennatter)
	97	KC696567	<i>Hepatozoon</i> sp. (Sandrennatter)
	97	HQ734788	<i>Hepatozoon</i> sp. (Mauergecko)
395 <i>C. caninus</i>	98	HQ734807	<i>Hepatozoon</i> sp. (North African Ocellated Lizard)
	98	KC342522	<i>Hepatozoon</i> sp. (Schauer- Klapperschlange)
396 <i>C. caninus</i>	97	HQ734806 HQ734787 HQ734788	<i>Hepatozoon</i> sp. (Mauergecko)
397 <i>C. caninus</i>	98	KM234613	<i>Hepatozoon</i> sp. (brasilianischer Gecko)
	98	HQ734806	<i>Hepatozoon</i> sp. (Mauergecko)
	97	KM234646	<i>Hepatozoon domerguei</i>

			(Malagasy cat-eyed snake)
--	--	--	---------------------------

6. Ergebnisse der phylogenetischen Analysen

Das "Multiple Sequence Alignment" wurde unter Verwendung von Clustal W (Feng and Doolittle, 1987; Thompson et al., 1994) durchgeführt. Hierzu wurde als Methode „Full Alignment“ gewählt und ein „Dynamic Alignment“ mit den Parametern „Gap open penalty“ von 10, „Gap extension penalty“ von 5 und „Delay divergent sequences“ von 40 % durchgeführt. Neben den mit dem Primerpaar HepF300 und Hep900 aus den beprobten Reptilien erhaltenen Sequenzen wurden verschiedene Sequenzen aus der Gendatenbank einbezogen. Im Einzelnen waren dies *Hepatozoon americanum* (AF176836), *Hepatozoon felis* aus einer Hauskatze (AY628681) und einem indischen Leoparden (HQ829443), *Hepatozoon canis* aus einem Wasserschwein (EF622096) und einem Hund (JN217102), *Hepatozoon sipedon* (JN181157), *Hepatozoon ayorgbor* (EF157822), *Hepatozoon catesbiana* (AF130361), *Hepatozoon domerguei* (KM234646), *Hepatozoon* sp. aus einem Mauergecko (HQ734806), einer maurischen Bachschildkröte (*Mauremys leprosa*) (KJ740753), einer Sandrennnatter (*Psammophis elegans*) (KC696568), einem Brillenkaiman (*Caiman crocodilus yacare*) (KJ413132), einer Klapperschlange (*Crotalus durissus terrificus*) (KC342526), einer Mauereidechse (HQ734793), sowie einer Wüstenspringmaus (KJ499535) und einer Beutelratte (FJ719813), *Haemogregarina balli* aus einer Schnappschildkröte (HQ224959), *Haemogregarina* sp. aus einer dunklen Pelomeduse (*Pelusios subniger*) (KF257925), *Haemogregarina stephanovi* aus einer kaspischen Bachschildkröte (*Mauremys rivulata*) (KF257927), *Haemogregarina* syn. *Hepatozoon fitzimonsi* aus einer afrikanischen Schnabelbrustschildkröte (*Chersina angulata*) (KJ702453) *Hemolivia mariae* aus einer Tannenzapfenechse (*Tiliqua rugosa*) (JN211118), *Hemolivia mauritanica* aus einer maurischen Landschildkröte (KF992709) und einer Breitrandschildkröte (KF992710), *Karyolysus* sp. aus einer Waldeidechse (*Zootoca vivipara*) (KJ461946) und *Dactylosoma ranarum* aus einem Teichfrosch (HQ224958).

Für das Alignment wurden die Sequenzen manuell auf einheitliche Längen von 570 bp zugeschnitten. Das mittels Software errechnete Alignment wurde für einzelne Sequenzen und Positionen manuell durch Einfügen, Verlängern oder

Kürzen von Lücken angepasst.

Basierend auf den Daten des Alignments wurde mittels Distanz-Matrix-Methode unter Verwendung einer Neighbour-Joining Methode (Saitou and Nei, 1987) sowie Bootstrapping nach Felsenstein (1985) mit Hilfe der Software DNAMAN ein phylogenetischer Baum erstellt, der in Abbildung 19 dargestellt ist. Dabei sind die in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Sequenzen, aus den grünen Hundskopfschlingern (*Corallus caninus*), in grün, die Sequenzen aus den Königspythons (*Python regius*) in rot und die Sequenzen aus den westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten (*Pelusios castaneus*) in blau markiert.

Die neun Haplotypen aus *Corallus caninus* bildeten drei Gruppen, und zwar eine erste Gruppe aus 11 Sequenzen mit sieben Haplotypen, die sich mit einer Hepatozoon-Sequenz aus einer Klapperschlange zusammenlagerten. Eine zweite Gruppe, bestehend aus einem Haplotyp (aus Tier Nr. 194) und eine dritte Gruppe mit einem Haplotyp und zwei Sequenzen (Nr. 103 und 396) bildeten gemeinsam eine Schwestergruppe zu einer Gruppe mit Sequenzen unter anderem von *Hepatozoon ayorgbor*, *Hepatozoon domerguei* und den in der vorliegenden Untersuchung aus Königspythons erhaltenen Sequenzen. Die drei Haplotypen aus den Königspythons ordnen sich in zwei Gruppen ein. Zwei Haplotypen gruppierten sich zusammen mit *Hepatozoon ayorgbor*, einer bei Königspythons beschriebenen Art, sowie mit Sequenzen von *Hepatozoon* sp. aus einer Sandrennnatter und einer Wüstenspringmaus. Der dritte bei den Blutparasiten aus den Königspythons nachgewiesene Haplotyp clusterte mit *Hepatozoon domerguei* und *Hepatozoon* sp. aus anderen Reptilien.

Die beiden aus *Pelusios castaneus* erhaltenen Haplotypen waren deutlich verschieden von den anderen in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Haplotypen. Sie ordneten sich im phylogenetischen Stammbaum in der Nähe von *Haemogregarina* sp. aus verschiedenen Schildkrötenarten, jedoch auch in der Nähe einer als *Hepatozoon* sp. bezeichneten Sequenz aus einer maurischen Bachschildkröte ein. Die Einordnung der Sequenzen aus den Klappbrust-Pelomedusenschildkröten wurde in der vorliegenden phylogenetischen Untersuchung nur mit niedrigen Bootstrapwerten von unter 50 % gestützt.

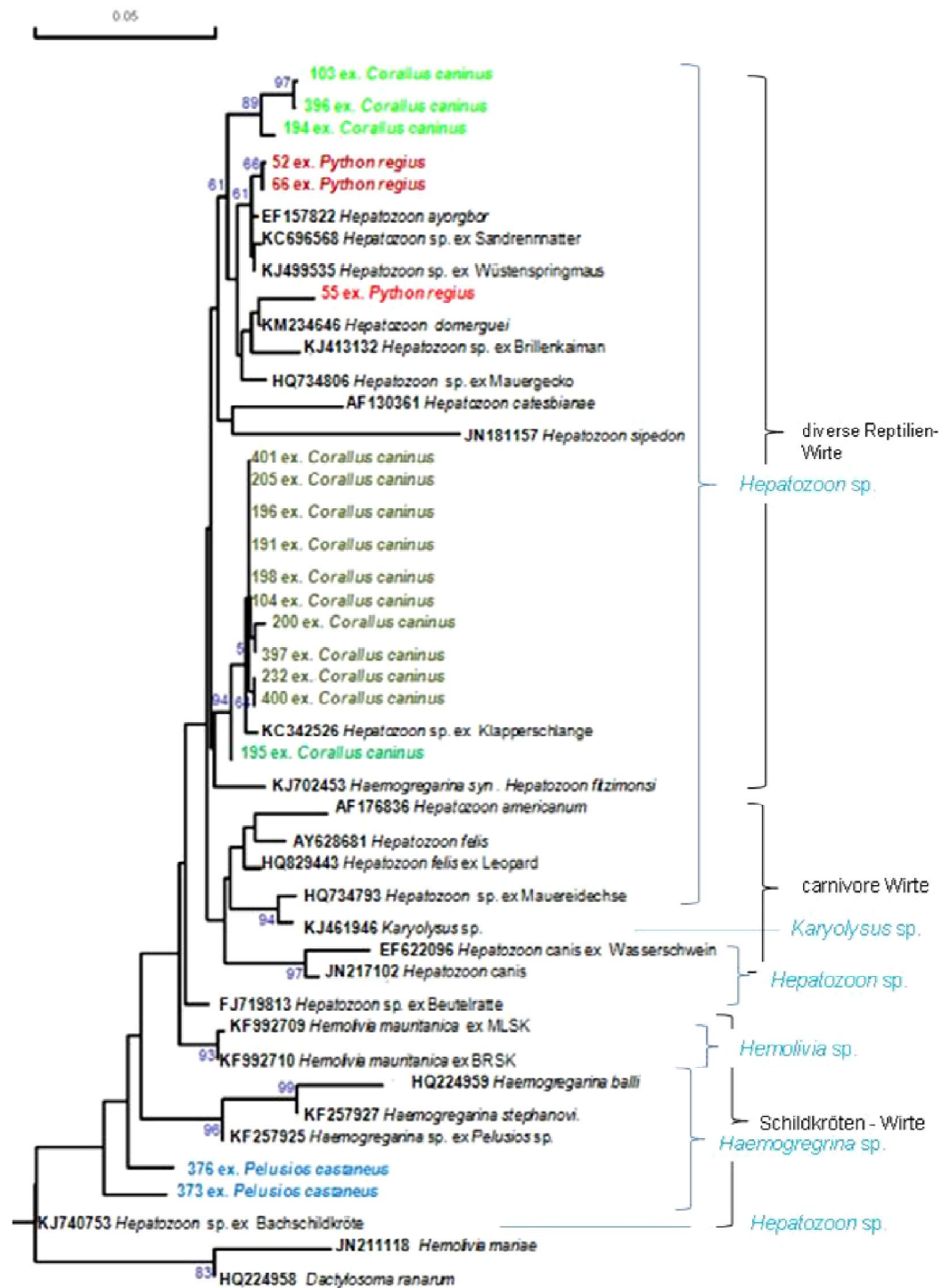


Abbildung 19: phylogenetischer Stammbaum basierend auf einer Neighbor-Joining-Analyse. Bootstrap-Werte in Prozent für die einzelnen Knoten des Baumes sind nur für Werte größer als 50 angegeben.

6.1. Vergleich der phylogenetischen Beziehungen der Hämogregarinen mit der Art oder geographischen Herkunft der Reptilienwirte

Die im Rahmen der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Sequenzen stammen aus drei verschiedenen Reptilienspezies unterschiedlicher Herkunft. Die Königspythons und die westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten stammten aus Togo (Afrika). Von den grünen Hundskopfschlingern, bei denen neun Haplotypen identifiziert wurden, stammten mit Ausnahme eines Tieres (Nr. 191), das aus Französisch-Guyana (Südamerika) importiert war, alle aus Surinam (ebenfalls Südamerika). Die Sequenz der Hämogregarinen aus dem letztgenannten Tier gehörte dabei dem hier am häufigsten nachgewiesenen Haplotyp an und war identisch mit den Sequenzen aus vier anderen *Corallus caninus* aus Surinam.

Bei den Sequenzen die aus der Gendatenbank entnommen wurden und bei denen Ortsangaben verfügbar waren, stammten folgende Spezies aus Südamerika: *Hepatozoon canis* aus einem Wasserschwein (EF622096) und *Hepatozoon* sp. aus einem Brillenkaiman (KJ413132) und einer Klapperschlange (KC342526) aus Brasilien und einem Hund aus Kolumbien (JN217102) und *Hepatozoon* sp. aus einer Beutelratte aus Chile (FJ719813).

Aus Afrika stammten die folgenden Hämogregarinen: *Hepatozoon ayorgbor* aus einem Königpython aus Ghana (EF157822), *Hepatozoon* sp. aus einem Mauergecko (HQ734806) und einer Mauereidechse (HQ734793) aus Marokko *Hepatozoon* sp. aus einer Sandrennnatter aus Mali (KC696568), *Hepatozoon* sp. aus einer Wüstenspringmaus aus Mauretanien (KJ499535) und *Haemogregarina* sp. aus einer dunklen Pelomeduse (*Pelusios subniger*) aus Mosambik (KF257925).

Europäischen Ursprungs waren *Hepatozoon felis* aus Hauskatzen (AY620232, AY628681) aus Spanien, *Hepatozoon* sp. aus einer maurischen Bachschildkröte (*Mauremys leprosa*) aus Spanien (KJ740753) und *Karyolysus* sp. aus einer Waldeidechse (*Zootoca vivipara*) aus Polen (KJ461946).

Aus Asien stammten *Hepatozoon felis* aus einem indischen Leoparden (HQ829443) und *Haemogregarina stephanovi* aus einer kaspischen Bachschildkröte (*Mauremys rivulata*) aus Syrien (KF257927).

Hemolivia mariae aus einer Tannenzapfenechse (*Tiliqua rugosa*) (JN211118) stammte aus Australien.

Somit wurden mit Ausnahme der Antarktis Parasitensequenzen von allen Kontinenten und von vielen Reptilienarten in die Analysen mit einbezogen.

Dabei zeigte sich, dass sich die Sequenzen bzw. Haplotypen nicht entsprechend ihrer geographischen Herkunft gruppieren. Die sich im Stammbaum ermittelten verwandschaftlichen Beziehungen spiegelten zudem nicht die Verwandtschaftsbeziehungen der Reptilienwirtstierarten wider (Abb. 20).

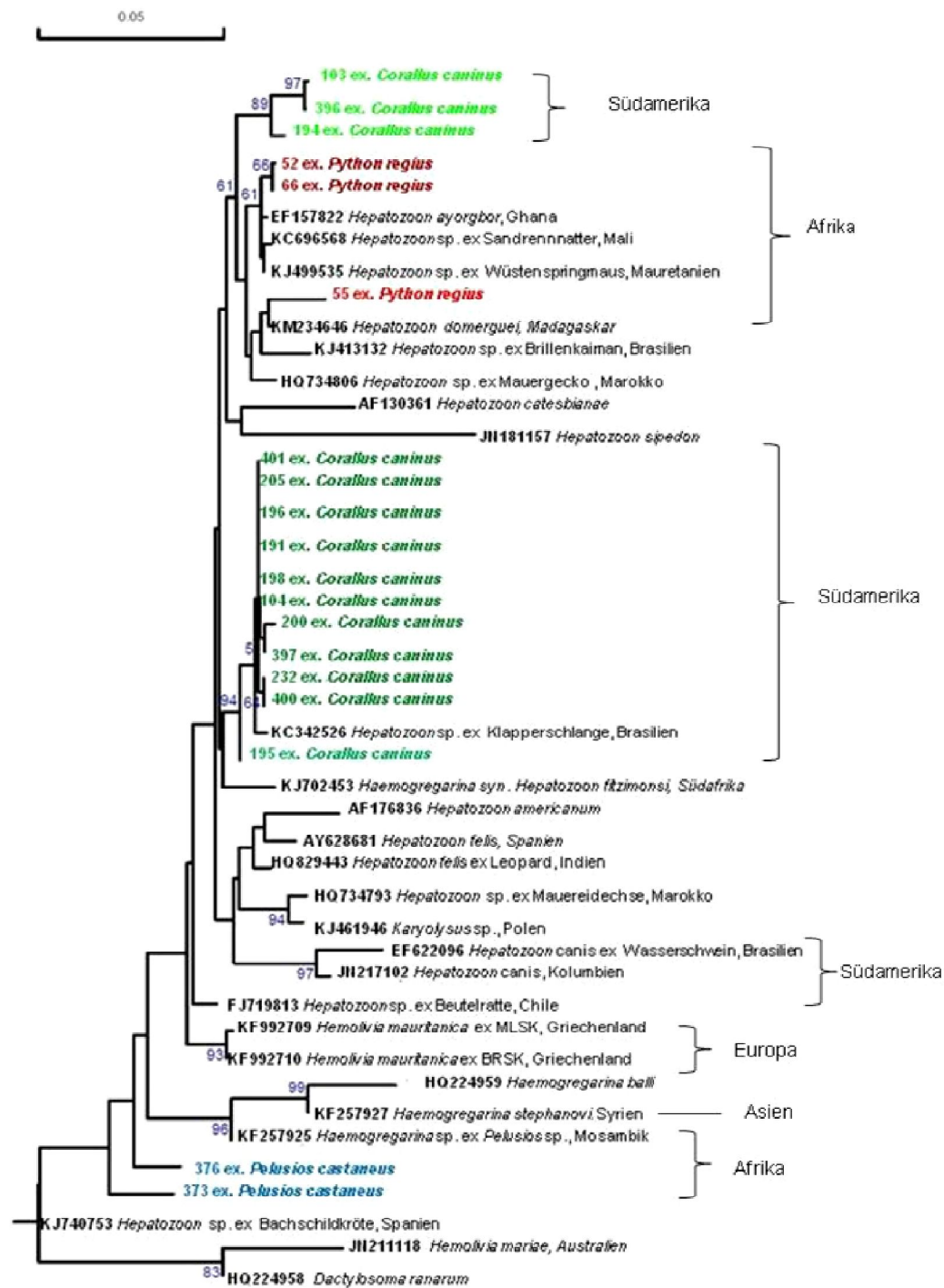


Abbildung 20: phylogenetischer Stammbaum einschließlich geografischer Herkunft der Wirbeltierwirte

7. Vergleich der erhaltenen Hämogregarinen-Sequenzen mit der Morphologie der lichtmikroskopisch nachgewiesenen Stadien in den Erythrozyten des Reptilienwirts

Wie unter 2.2. bereits beschrieben wurden in einer parallel durchgeführten Studie von HALLA (2015) die Hämogregarinenstadien in den Reptilienerythozyten lichtmikroskopisch untersucht und deren Morphologie beschrieben. Hierbei zeigte sich, dass sich die Morphologie der Parasitenstadien von Reptilienwirt zu Reptilienwirt deutlich unterschied.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden aus den Reptilienwirten 14 verschiedene Hämogregarinen-Haplotypen erhalten. Dabei unterschieden sich die Haplotypen aus den einzelnen Reptilienwirten ebenfalls deutlich.

In der nachfolgenden Tabelle 7 werden die in Abbildung 16 dargestellten Morphotypen der gefundenen Hämogregarinen mit den erhaltenen Haplotypen verglichen. Dabei wird der bei den Königspythons gefundene Morphotyp mit 1, die bei den grünen Hundskopfschlingern gefundenen Morphotypen mit 2 und 3 und die Morphotypen der Klappbrust-Pelomedusenschildkröten mit 4, 5 und 6 bezeichnet. Wurden mehrere Morphotypen gefunden steht jeweils der häufigere Typ an erster Stelle. Die 14 erhaltenen Haplotypen sind mit den Buchstaben A-N gekennzeichnet.

Tabelle 6: Vergleich der Morphologie der erythrozytären Parasitenstadien mit den erhaltenen Sequenzen

Reptilienwirt Nr.	Sequenz	Morphotyp
52 <i>P. regius</i>	A	1
55 <i>P. regius</i>	B	1
66 <i>P. regius</i>	C	1
373 <i>P. castaneus</i>	D	5
376 <i>P. castaneus</i>	E	4
103 <i>C. caninus</i>	F	2, 3
104 <i>C. caninus</i>	G	2, 3

191 <i>C. caninus</i>	G	2
194 <i>C. caninus</i>	H	2
195 <i>C. caninus</i>	I	2, 3
196 <i>C. caninus</i>	G	2
198 <i>C. caninus</i>	J	2
200 <i>C. caninus</i>	K	2, 3
205 <i>C. caninus</i>	G	2, 3
232 <i>C. caninus</i>	L	2, 3
396 <i>C. caninus</i>	M	3
397 <i>C. caninus</i>	N	3, 2
400 <i>C. caninus</i>	L	3, 2
401 <i>C. caninus</i>	G	2, 3

V. DISKUSSION

1. Auswahl der Proben

1.1. Anzahl einbezogener Tiere und Tierarten

Die Anzahl der einbezogenen Tiere und die untersuchten Tierarten waren stark vom Angebot an Tieren passender Größe beim Großhändler zu den Zeitpunkten der Probenentnahme abhängig. Es wurde versucht, 25 Exemplare jeder Spezies zu untersuchen, was jedoch im Falle der westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten nicht gelang ($n=16$), da diese nur bei einem der beiden Großhändler an einem Probenentnahmezeitpunkt und dann nicht in ausreichender Zahl vorhanden waren. Bei den Königspythons ($n=20$) wurde die Zielanzahl ebenfalls nicht erreicht, da einer der beiden Großhändler ausschließlich frisch geschlüpfte Jungtiere zur Verfügung stellen konnte, die für die Blutprobenentnahme wegen ihres geringen Körpergewichts nicht geeignet waren. Außerdem wurden in der vorliegenden Untersuchung Reptilien aus einer beschränkten Zahl unterschiedlicher Herkunftsländer erfasst. Die hier ermittelten Befallsraten sind daher nicht als statistisch abgesicherte Angaben zur Prävalenz der Hämogregarinen bei nach Deutschland importierten Reptilien aufzufassen. Das Ziel der vorliegenden Studie war es lediglich, erste orientierende Angaben zur Größenordnung der Befallsrate und vor allem einen Einblick über die Identität und Vielfalt mit über importierte Reptilien nach Deutschland eingeführten Hämogregarinen zu erhalten.

1.2. Vorauswahl der untersuchten Blutproben

Die Auswahl der Blutproben, die mit PCR untersucht wurden, erfolgte aufgrund der mikroskopischen Ergebnisse der vorangegangenen Studie (Halla, 2015). Es wurden nur Proben von Reptilien, bei denen intra-erythrozytäre, morphologisch als Hämogregarinen diagnostizierte Parasiten nachgewiesen worden waren, einbezogen. Lediglich von vier Reptilien war Blut nicht mehr verfügbar, sie wurden daher nicht weiter untersucht. Aufgenommen wurden alle als positiv beurteilten Proben unabhängig vom Grad der Parasitämie.

2. Methodik

2.1. Lagerung der Blutproben

Nicht bei allen Blutproben, in denen mikroskopisch Hämogregarinen nachgewiesen worden waren, wurde mit den verwendeten Primern ein PCR-Produkt erhalten. Eine mögliche Ursache könnte in den Lagerungsbedingungen der Blutproben liegen. Die heparinisierten Blutproben wurden vom Zeitpunkt der Entnahme bis zum Zeitpunkt der DNA-Extraktion über bis zu 32 Monate bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Möglicherweise hatte die lange Lagerungszeit einen Einfluss auf den Gehalt und die Integrität der Hämogregarinen-DNA. DNA ist nach ihrer Extraktion über einen sehr langen Zeitraum lagerbar. FREEMAN et al. (2003) untersuchten in ihrer Studie DNA aus Mundabstrichen und stellten keinen Unterschied zwischen den Proben, die bereits 4 Jahre lagerten und den unmittelbar vor Durchführung der PCR extrahierten fest. In der vorliegenden Untersuchung war bei einer ganzen Reihe von Blutproben, die lange bei 4 °C gelagert worden waren, die PCR-Amplifikation erfolgreich, so dass ein negativer Effekt möglicherweise zu vernachlässigen ist.

Einen weiteren möglichen negativen Einfluss auf den Nachweis von Hämogregarinen-DNA aus den Blutproben könnte das verwendete Antikoagulans (Heparin) bilden. Heparin gilt als ein potenter Polymerase-Inhibitor. Yokota et al. (1999) untersuchten in ihrer Studie den Einfluss von Heparin auf die PCR. Sie stellten einen deutlichen Einfluss von Heparin auf die Amplifikationsrate verschiedener Taq-Polymerasen fest. Der in dieser Arbeit zur DNA-Extraktion aus den Blutproben verwendete "DNeasy Blood & Tissue Kit" (Qiagen, Hilden, Deutschland) trennt jedoch nach eigenen Erfahrungen das in den Blutproben enthaltene Heparin effizient ab. Zudem wurde nur in einem Teil der heparinisierten Blutproben keine Amplifikation der Zielgene in der PCR festgestellt, so dass Heparin als Ursache als unwahrscheinlich anzusehen ist.

2.2. Auswahl des Zielgens

Als Zielgen für die PCR wurde das 18S rRNA-Gen ausgewählt. Dieses kodiert für die 40S-Untereinheit der Ribosomen, die in allen eukaryotischen Zellen maßgeblich an der Proteinbiosynthese beteiligt sind (Berg et al., 2007). Da dieses Gen an einem für die den Organismus überlebenswichtigen Vorgang (Proteinbiosynthese) beteiligt ist und es sich um einen relativ konserviertes Gen handelt, bei dem der Unterschied eines Basenpaares bereits eine andere Art

bedeuten kann (Rooney, 2004), eignet sich dieses Gen hervorragend für die Untersuchung von phylogenetischen Zusammenhängen auf Artniveau und auf höheren taxonomischen Ebenen. Für dieses Zielgen liegen zudem umfangreiche Vergleichssequenzen in der Genbank der NCBI vor. Fast alle publizierten Arbeiten, die sich mit der molekularbiologischen Differenzierung von Hämogregarinen beschäftigen, nutzten daher das 18S rRNA-Gen als Zielsequenz für taxonomische und phylogenetische Untersuchungen (Dvoráková et al., 2014; Haklová et al., 2013; Harris et al., 2013; Harris et al., 2011; Maia et al., 2011; Perkins and Keller, 2001; Wozniak et al., 1994). Lediglich SMITH et al. (1999) verwendeten die ITS- (internal transcribed spacer)-1-Region, einen Bereich zwischen dem 18S rRNA-Gen und dem 5,8S rRNA-Gen, der als etwas geringer konserviert gilt, als Ziel für ihre PCR.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCRs wurden bereits publizierten Primer verwendet, die das 18S rRNA-Gen als Zielsequenz haben.

2.3. PCR

Bei 33 von 44 Blutproben, in denen mikroskopisch Hämogregarinen nachgewiesen worden waren, wurden in der PCR Amplifikate erhalten. Die Effizienz der PCR und die Qualität der daraus erhaltenen Sequenzen unterschieden sich dabei deutlich zwischen den drei eingesetzten Tests. Mögliche Ursachen können in der unterschiedlichen Eignung der einzelnen Primer oder der verwendeten Reaktionsprotokolle zu finden sein.

2.3.1. Primer

Zur Amplifikation der 18S rDNA wurden drei unterschiedliche Primerpaare eingesetzt. Als erstes Primerpaar wurden die von PERKINS und KELLER (2001) entwickelten Primer HEMO1 und HEMO2 verwendet. Basierend auf Sequenzen von Hämogregarinen aus vier Echsen, darunter *Hemolivia mariae*, die mit dem von WOZNIAK et al (1994) entwickelten Primerpaar 18AP835.F und 18AP1488.R erzeugt worden waren, sowie den in der Genbank vorhandenen Sequenzen von *Plasmodium falciparum*, *Babesia bovis*, *Toxoplasma gondii* und *Lankesterella minima* konstruierten sie den Hämogregarinen-spezifischen „forward“ Primer HEMO1 und den Apikomplexa-spezifischen „reverse“ Primer HEMO2 (Perkins and Keller, 2001).

Das von Ujvari et al. (2004) entwickelte Primerpaar HepF300 und Hep900 wurde

als zweites Primerpaar eingesetzt. Dieses Primerpaar wurde basierend auf einem Vergleich konservierter Bereiche von *Hepatozoon canis*, *Hepatozoon catesbiana* und *Hepatozoon americanus* erstellt. Ziel war die Amplifikation von DNA von *Hepatozoon* sp. (Ujvari et al., 2004). Dies ist auch die Gattung, die bei Schlangen, die den Hauptanteil am Untersuchungsgut in der vorliegenden Dissertation ausmachten, am häufigsten beschrieben ist (Ball et al., 1967, 1969; Bashtar et al., 1984a; Bashtar et al., 1984b; Landau et al., 1972; Moco et al., 2002; Sloboda et al., 2007; Smith, 1996; Smith et al., 1994; Telford Jr et al., 2004; Telford Jr., 2010).

Als drittes Primerpaar wurden der von MEDLIN et al. (1988) entwickelte forward Primer A mod, der zur 18S rDNA von Eukaryoten als Zielsequenz hat, und der von WOZNIAK et al. (1994) entwickelte, für Blutparasiten des Stammes Apikomplexa spezifische, reverse Primer 18AP1488.R eingesetzt.

Mit dem Primerpaar HEMO1 und HEMO 2 wurden in der vorliegenden Untersuchung nur bei 11 von 44 Blutproben in der PCR Amplifikate erhalten und damit bei deutlich weniger Blutproben als mit dem Primerpaar HepF300/Hep900, mit dem bei 29 von 44 Blutproben Amplifikate erhalten werden konnten. Die Hoffnung, mit dem ziemlich unspezifischen Primerpaar A mod/18AP1488R, mit dem bei 23 von 44 Blutproben Amplifikate erhalten werden konnten, ein breiteres Erregerspektrum (*Hepatozoon* sp., *Haemogregarina* sp., *Karyolus* sp. und *Hemolivia* sp.) wurde nicht erfüllt. Dieses Paar erwies sich als zu unspezifisch, da bei grünen Hundkopfschlingern, Königspythons und Pelomedusen-Klappbrustschildkröten Wirts-DNA repliziert wurde.

HARRIS et al. (2011) nutzten für ihre Studie zur molekularen Charakterisierung von *Hepatozoon* sp. aus Reptilien von den Seychellen (Geckos, Skinkartige, Nattern, Blindschlangen) ebenfalls das Primerpaar HEMO1 und HEMO 2, sowie die Primer HepF300 und Hep900. Sie konnten dabei mit dem Primerpaar HEMO1 und HEMO2 bei 5 von 6 mikroskopisch als Hämogregarinen-infiziert bestimmten Proben eine Sequenz erhalten. Mit dem Primerpaar HepF300 und Hep900 erhielten sie jedoch Sequenzen von mehr Tieren und auch aus Proben, bei denen mikroskopisch keine Hämogregarinenstadien gefunden worden waren. Möglicherweise weisen die von Ujvari et al. (2004) entwickelten Primer eine höhere Sensitivität auf und sind daher in der Lage, auch bei Proben mit niedriger Parasitämie bessere Ergebnisse zu liefern.

Jedoch wurde in der vorliegenden Dissertation mit den Primern HepF300 und Hep900 in einem Fall (Sequenz ex *Python regius* Nr. 51) DNA amplifiziert, die bei der BLAST-Analyse die höchste Übereinstimmung mit diversen Pilz und Algenspezies aufwies. Auch TOMÉ et al. (2012, 2013, 2014) stellten fest, dass mit diesem Primerpaar neben Hämogregarinen-DNA auch DNA von Pilzspezies und sogar *Sarcocystis* sp. und *Caryospora* sp. vervielfältigt werden kann. Die Spezifität dieses Primerpaares ist also möglicherweise geringer als die des Primerpaares HEMO1/HEMO2, mit dem TOMÉ et al. (2013) lediglich DNA von *Hepatozoon* sp. vervielfältigen konnten.

Die Arbeit von HAKLOVÁ-KOČIKOVÁ et al. (2014) zeigt, dass mit den in dieser Dissertation verwendeten Primerpaaren auch *Karyolysus* sp. repliziert werden kann. Auch in der Studie von Cook et al. (2014) über *Haemogregrina fitzimonsi* führten nur die PCR-Ergebnisse von Primerpaar HEMO1/HEMO2 und HepF300/Hep900 zu brauchbaren Sequenzen.

Somit wurden mit den in der vorliegenden Untersuchung verwendeten Primern in der Vergangenheit ein breites Spektrum der bei Reptilien beschriebenen Hämogregarinengattungen nachgewiesen. Das Phänomen, dass nicht bei allen Blutproben, bei denen mikroskopisch Hämogregarinen nachgewiesen wurden, Amplifikate entstanden, wurde allerdings auch in anderen Studien festgestellt. HAKLOVÁ et al. (2013) untersuchten verschiedene Schlangen aus Afrika, Asien und Europa zunächst mikroskopisch und anschließend mittels PCR auf den Befall mit Hämogregarinen. Sie nutzen hierzu das von PERKINS und KELLER entwickelte und in dieser Dissertation ebenfalls eingesetzte Primerpaar HEMO1 und HEMO2 (Perkins and Keller, 2001) und stellten fest, dass zehn der mikroskopisch Hämogregarinen-positiv getesteten Proben durch die Primer nicht amplifiziert wurden. (Haklová et al., 2013)

Mehrere Ursachen können für die ausbleibende Amplifikation diskutiert werden. Möglicherweise war die Parasitämie der Blutproben zu gering und lag unter der Nachweisgrenze des verwendeten PCR-Verfahrens.

Außerdem könnten bei manchen Hämogregarinenarten vorkommende Mutationen im Bereich der Primerregion vorliegen, die eine effiziente Bindung der Primer und damit eine effiziente Amplifikation des Zielgens verhindern, vorliegen. So reichen schon einzelne „Mismatches“, also Fehlpaarungen, vor allem am 3'-Ende der Primerregion aus, um eine Amplifikation zu verhindern (Sipos et al.,

2007; Stadhouders et al., 2010), so dass möglicherweise mit den verwendeten Primern nicht alle Hämogregarinenarten detektiert werden können.

Für die Zukunft wäre es wünschenswert, unter anderem auf Grundlage der im Rahmen dieser Dissertation entdeckten neuen Hämogregarinen-Sequenzen neue Primer zu entwickeln, die DNA eines breiteren Erregerspektrums amplifizieren, um dem Ziel einer PCR, die in der Routinediagnostik eingesetzt werden kann, einen Schritt näher zu kommen.

2.3.2. Reaktionsprotokoll

Für die Durchführung der PCRs mit den Primern HepF300/Hep900 und HEMO1/HEMO2 wurden im wissenschaftlichen Schrifttum publizierte Protokolle für die chemischen Reaktionsbedingungen und für das Thermoprofil verwendet. Die PCR mit dem Primerpaar HEMO1/HEMO2 wurde wie bei HARRIS et al. (2011) beschrieben durchgeführt. Beim zweiten Primerpaar (HepF300/Hep900) wurde zunächst ebenfalls das von HARRIS et al. (2011) beschriebene Protokoll verwendet (Harris et al., 2011). Da in einigen Ansätzen jedoch nur schwache oder gar keine Amplifikationsprodukte im Agarosegel erkennbar waren, wurde in einem zweiten Durchgang zur Erhöhung der Menge an Amplifikat die Anzahl an durchgeführten PCR-Zyklen von 35 auf 45 bzw. 50 erhöht. Dadurch konnten letztendlich weitere Sequenzen erhalten werden. Mit der Erhöhung der Anzahl der Zyklen steigt jedoch auch das Risiko an Fehlern, wie z.B. der Amplifikation von unspezifischen Produkten (Raeymaekers, 1993; Sipos et al., 2007).

Das dritte Primerpaar bestand aus dem von MEDLIN et al. (1988) entwickelten forward Primer A mod und dem von WOZNIAK et al (1994) entwickelten reversen Primer 18AP1488R. Bei MEDLIN et al. (1988) fanden sich nur ungenaue Angaben bezüglich des verwendeten PCR-Protokolls. Deshalb wurde für dieses Primerpaar unter Einbeziehung der bei WOZNIAK et al (1994) beschriebenen Konditionen ein Protokoll erstellt, mit dem in der PCR sowohl Amplifikate erzielt werden konnten als auch Sequenzen erhalten wurden.

2.3.3. Sequenzierung

In der vorliegenden Untersuchung konnten mit der angewandten Methode der direkten Sequenzierung von PCR-Produkten mittels Sanger-Technologie nicht von allen PCR-Produkten auswertbare Sequenzen oder zum Teil nur sehr kurze Sequenzen erhalten werden, wie in Tabelle 3 dargestellt ist. Es zeigte sich bei

Betrachtung der bei der Sequenzierung aufgezeichneten Chromatogramme, dass Mischsequenzen vorlagen. Es ist also zu vermuten, dass die Reptilien, von denen die Blutproben stammten, mit mehreren unterschiedlichen Erregern oder Haplotypen gleichzeitig infiziert waren, und dass die DNA dieser Erreger in der PCR gleichzeitig amplifiziert wurde. Da bei allen einbezogenen Reptilienarten mehrere Hämogregarinen-Haplotypen nachgewiesen wurden und die Reptilien der einzelnen Arten aus demselben Gebiet stammen, ist es wahrscheinlich, dass Mischinfektionen vorlagen und für den Misserfolg der Sequenzierung verantwortlich sind. In Einzelfällen wurden in der vorliegenden Studie bei Wiederholung der PCR-Reaktion und erneuter Sequenzierung auswertbare Sequenzen erhalten (Daten hier nicht dargestellt). Möglicherweise haben dabei in den ersten Zyklen der PCR die Primer zufällig nur an die DNA eines Haplotyps gebunden, und dieser Haplotyp wurde in den weiteren PCR-Zyklen stark vermehrt.

Die Methodik der konventionellen PCR mit anschließender direkter Sequenzierung des PCR-Produktes ist nicht gut dazu geeignet, Mischinfektionen nachzuweisen, wenn mit den verwendeten Primern DNA der unterschiedlichen Erregervarianten amplifiziert werden kann. Wie schon erwähnt, spielen hier Zufallseffekte in den ersten Zyklen der PCR eine entscheidende Rolle dafür, welche und wie viele unterschiedliche DNA-Varianten vermehrt werden. Die PCR mit direkter Sequenzierung kann zudem nur dann Hinweise auf Varianten des PCR-Produktes liefern, wenn sich diese Varianten nur in einzelnen Positionen unterscheiden. Insbesondere vorkommende Deletionen oder Insertationen bei einer Variante führen in der Regel zu einem nicht auswertbaren Sequenzierungsergebnis. Klonierung des PCR-Produktes vor der Sequenzierung kann das Problem bei der Sequenzierung zwar lösen, allerdings können mittels PCR/Klonierung/Sequenzierung Mischinfektionen mit verschiedenen Erregern auch nur dann nachgewiesen werden, wenn die einzelnen Varianten in einem ausreichend hohen Anteil in der DNA vorliegen. In Zukunft werden sicherlich neue molekularbiologische Techniken, wie die des "deep sequencing" bei der Beantwortung von Fragestellungen, die sich in Zusammenhang mit Koinfektionen mit nahe verwandten Erregern stellen, verstärkt eingesetzt werden. Sie besitzen zum Nachweis von Mischinfektionen eine deutlich höhere Sensitivität als die klassische PCR mit Klonierung und Sequenzierung (Quiñones-Mateu et al., 2014)

Jeweils eine Sequenz aus einem Königspython und aus einem grünen Hundskopfschlinger waren mit einer Länge von ca. 50bp deutlich zu kurz, um eine Aussage zu den Verwandtschaftsverhältnissen mit anderen Sequenzen zu treffen. Bei solch kurzen Fragmenten finden sich meist zu wenige diskriminierende Positionen, v.a. wenn es sich um solch stark konservierte Bereiche wie das 18S rRNA-Gen handelt

Einige der erhaltenen Sequenzen wiesen trotz Sequenzierung in beide Richtungen noch "N's" auf. Dies sind Bereiche, bei denen bei der Sequenzierung nicht festgestellt werden konnte, welche Base sich an dieser Position des Gens befindet. Möglicherweise sind auch diese Bereiche dadurch entstanden, dass die untersuchten Reptilien nicht nur mit einem, sondern mit mehreren unterschiedlichen Haplotypen befallen waren.

3. Sequenzanalysen

3.1. Phylogenetische Einordnung

Bei der BLAST-Analyse der in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen Sequenzen ergab sich, dass nur eine Sequenz, die aus einem Königspython (Nr. 66) erhalten wurde, eine 100%ige Übereinstimmung mit einer bereits in der Genbank vorhandenen Sequenz aufwies. Dabei handelte es sich um eine als *Hepatozoon* sp. bezeichnete Sequenz aus einer Sandrennnatter (*Psammophis elegans*) aus Mali (Tome et al., 2013). Alle anderen im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Sequenzen wiesen keine 100%ige Übereinstimmung mit bereits in der Gendatenbank vorhandenen Sequenzen auf. Es handelt sich also um molekularbiologische Erstbeschreibungen der restlichen bei den Reptilien in der vorliegenden Studie gefundenen Hämogregrinen. Anhand der Vergleiche der erhaltenen Sequenzen mit Sequenzen aus der Genbank des NCBI im Rahmen einer phylogenetischen Analyse mit Erstellung eines Stammbaumes wurden für die in der vorliegenden Untersuchung erhaltenen partiellen 18S rDNA-Sequenzen Verwandtschaftsbeziehungen ermittelt. Bei den Analysen sollte zunächst geklärt werden, welcher Gattung sich die in der vorliegenden Untersuchung zurodnen. Im phylogentischen Stammbaum (Abb. 19), gruppieren sich die Sequenzen aus den Königspythons und grünen Hundskopfschlingern zusammen mit einer ganzen Reihe von als *Hepatozoon* sp. deklarierten Sequenzen. Da bei Schlangen vor allem *Hepatozoon* sp. beschrieben ist, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den gefundenen Sequenzen tatsächlich um

Hämogregarinen dieser Gattung handelt.

Die aus den Proben der Klappbrust-Pelomedusenschildkröten erhaltenen Sequenzen, die bei der BLAST-Analyse die höchsten Identitäten mit einigen als *Hepatozoon* sp. deklarierten Sequenzen und mit als *Haemogregarina* sp. und *Hemolivia* sp. bezeichneten Sequenzen gezeigt hatten, ordneten sich im phylogentischen Stammbaum als Schwestergruppe von *Haemogregarina* sp., jedoch auch bei einer als *Hepatozoon* sp. bezeichneten Sequenz aus einer maurischen Bachschildkröte (*Mauremys leprosa*) aus Spanien (KJ470753) ein. Da die Aufspaltung der Äste des phylogentischen Baumes in diesem Bereich nur durch Bootstrapping-Werte von unter 50 gestützt wird, ist diese Einordnung jedoch als relativ unsicher anzusehen. Hier wären weitere Untersuchungen unter Einbeziehung zusätzlicher Sequenzen von Erregern, die idealerweise anhand ihres Entwicklungszyklus eindeutig charakterisiert wurden und eventuell auch unter Einbeziehung weiterer Zielgene, zum Beispiel der ITS-Regionen der rDNA, erforderlich. Anhand der vorliegenden Informationen lassen sich die Hämogregarinensequenzen aus den westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten nicht eindeutig einer Gattung zuordnen. Bei der Betrachtung der auf der Basis der in der Genbank verfügbaren Sequenzen zeigte sich jedoch ein aktuelles Problem der Taxonomie der Hämogregarinen. So wurden häufig Parasiten, bei denen lediglich das Gamontenstadium im Blut der Reptilienwirte bekannt ist, auf Basis der Reptilienwirte und der Gamonten-Morphologie einer Gattung zugeordnet. Es ist allerdings bekannt, dass dazu Kenntnisse der Entwicklung im Avertenbraten-Endwirt erforderlich sind (Ball, 1967). Daraus ergibt sich, dass vermutlich nicht alle Sequenzen in der Genbank in Bezug auf den Herkunftsorganismus korrekt klassifiziert sind. Bei der BLAST-Analyse fiel zudem auf, dass einige als Schlangen-DNA bezeichnete Sequenzen eine hohe Übereinstimmung mit *Hepatozoon* sp. aufwiesen wie z.B. eine als genomische DNA der Wüsten-Hornvipere (*Cerastes cerastes*) bezeichnete Sequenz (EF125058). Diese Sequenz wies neben einer bis zu 98%igen Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Studie erhaltenen Hämogregarinen-Sequenzen aus den grünen Hundskopfschlingern auch eine 99%ige Identität mit einer Sequenz von *Hepatozoon ayorgbor* (EF157822) auf. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei den als Schlangen-DNA interpretierten Sequenzen in Wirklichkeit um Parasiten-DNA handelt.

Bei der Betrachtung der phylogenetischen Beziehungen zeigte sich zudem, dass

sich eine Sequenz der Gattung *Karyolysus* inmitten der Hepatozoon-Cluster eingruppierte und die Gattung *Hepatozoon* dadurch paraphyletisch wurde, wie auch in anderen Untersuchungen beschrieben (Barta et al., 2012). Die Einordnung von *Karyolysus* innerhalb von *Hepatozoon* wird auch durch neuere Untersuchungen gestützt, bei der eine ganze Reihe von *Karyolysus*-Sequenzen einbezogen wurden (Haklová-Kočíková et al., 2014). Es ist daher zu erwarten, dass in Zukunft auf Gattungsebene Revisionen zu erwarten sind.

Eine weitere Fragestellung der vorliegenden Untersuchung war, ob sich die nachgewiesenen Blutparasiten derselben Art zuordnen ließen. Beim Vergleich der mit dem Primerpaar HepF300 und Hep900 (Ujvari et al., 2004) erhaltenen Hämogregarinensequenzen fiel auf, dass die fünf erhaltenen Sequenzen aus den Königspythons und Pelomedusen-Klappbrustschildkröten aus Togo sich deutlich unterschieden. Die drei Sequenzen aus den Königspythons positionierten sich an zwei unterschiedlichen Positionen im Stammbaum innerhalb der Gattung *Hepatozoon*. Da es sich bei der hier analysierten 18S rDNA um ein Gen handelt, das auf Artebene relativ stark konserviert ist, und sich manche Arten lediglich in einer Position unterscheiden (Wu et al., 2003), sind die erzielten Ergebnisse so zu interpretieren, dass es sich bei den nachgewiesenen Parasiten um unterschiedliche Arten handelt. Es scheint somit auch bei derselben Wirtstierart mehrere Hämogregarinenarten im gleichen Verbreitungsgebiet zu geben. Diese Auffassung wird auch durch die Tatsache gestützt, dass aus einigen Reptilien Mischsequenzen erhalten wurden.

Aus den grünen Hundskopfschlingern wurden insgesamt neun verschiedene Haplotypen erhalten. Dreizehn der 14 Tiere, aus denen Sequenzen analysiert wurden, stammten aus Surinam und eines aus Französisch-Guyana. Dabei stimmte die Sequenz, die aus dem grünen Hundskopfschlinger, der aus Französisch-Guayana stammte, mit Sequenzen aus einigen Tieren aus Surinam zu 100 % überein. Es kann hier nicht entschieden werden, ob tatsächlich jedem Haplotyp ein Artrang zukommt. Da die Sequenzen der Hämogregarinen aber innerhalb der Gattung *Hepatozoon* vier unterschiedliche Gruppen bildeten, könnte es sich hier um mindestens vier verschiedene *Hepatozoon*-Arten handeln.

Ob die hier erstmals molekularbiologisch charakterisierten Hämogregarinen neue Arten darstellen oder sich schon beschriebenen Arten zuordnen, kann derzeit nicht entschieden werden. So existieren DNA-Sequenzinformationen nicht für alle

bisher mit mikroskopischen Untersuchungen und anhand ihrer Morphologie charakterisierten, zum Teil auch mit Artnamen bezeichneten Hämogregarinen der Reptilien. Damit die erhaltenen Sequenzen einer bereits beschriebenen Hämogregarinen-Art zugeordnet werden könnten, müssen daher phänotypisch charakterisierte Arten, für die insbesondere Informationen zur Entwicklung im Endwirt vorliegen, zusätzlich mit molekularbiologischen Methoden charakterisiert werden.

Es ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den Klappbrust-Pelomedusenschildkröten nachgewiesenen Hämogregarinen um *Haemogregarina pelusiensi* handelt. Diese Art wurde von PIENAAR (1962) bei *Pelusios sinuatus*, einer ostafrikanischen Klappbrustschildkrötenart, beschrieben. Beachtet man die Tatsache, dass das Verbreitungsgebiet von *Pelusios sinuatus* an das der in dieser Studie untersuchten westafrikanischen Klappbrustschildkröten (*Pelusios castaneus*) grenzt und bezieht die morphologischen Beschreibungen von HALLA (2015) der hier molekularbiologisch charakterisierten Hämogregarinen mit ein, könnte es sich bei den Hämogregarinen, die zu einer der beiden erhaltenen Sequenzen gehören, um die als *Haemogregarina pelusiensi* bezeichnete Art handeln (Halla, 2015; Pienaar, 1962).

SLOBODA et al. (2007) beschrieben eine neue Hämogregarinenart bei Königspythons, die sie als *Hepatozoon ayorgbor* bezeichneten. Von dieser Art ist auch die Sequenz in der Gendatenbank vorhanden. Jedoch unterscheiden sich die Sequenzen, die aus den hier einbezogenen Königspythons gewonnen werden konnte deutlich von dieser Sequenz, so dass es sich bei den gefundenen Sequenzen um andere Arten handeln muss.

Verschiedene Autoren wie z.B. MUTSCHMANN (2002) berichten über Befall mit Hämogregarinen bei grünen Hundskopfschlingern, jedoch ohne eine genaue Artbezeichnung zu verwenden. Somit lassen sich die neun verschiedenen gefundenen Hämogregarinen-Sequenzen auch unter Zuhilfenahme der morphologischen Eigenschaften keiner bestehenden Art zuordnen.

Es besteht noch viel weiterer Forschungsbedarf bis die Artzuordnungen der Hämogregarinen zu ihren Reptilienwirten endgültig geklärt sind und somit sind weitere Arbeiten zu dieser Thematik nötig. Derzeit ist unklar, wie die in phylogenetischen Untersuchungen ermittelten Verwandtschaftsbeziehungen der

Hämogregarinen, insbesondere der Arten der Gattung *Hepatozoon*, zu bewerten sind oder welche biologischen Eigenschaften widergespiegelt werden. So finden sich keine Hinweise auf Zusammenhänge mit der geographischen Herkunft der Parasiten oder mit der Evolution der Reptilienwirte oder der Endwirte/Vektoren, wie auch in anderen Untersuchungen ebenfalls festgestellt wurde (Haklová et al., 2013; Tomé et al., 2012). Im phylogenetischen Stammbaum (Abb 19) gruppierten sich die aus den Schlangen erhaltenen Sequenzen wie bereits beschrieben zwischen den diversen *Hepatozoon* sp. -Sequenzen ein. Darunter finden sich neben Sequenzen aus verschiedenen Reptilien (Schlangen, Echsen, Kaiman) auch Sequenzen aus Nagetieren und Amphibien. Da es sich bei Hämogregarinen um Blutparasiten mit einem zwei- bis dreiwirtigen Entwicklungszyklus handelt und Nager und Amphibien zum Beutespektrum von Schlangen gehören stützt diese Beobachtung die unter anderem von Tomé (2012) aufgestellte These, dass die phylogenetische Beziehungen mit Nachweis in unterschiedlichen Wirbeltierwirten auch Räuber-Beute-Beziehungen widerspiegeln und dass bei den Hämogregarinen ein dreiwirtiger Zyklus mit Infektion von Reptilien über ihre Nahrung eine große Relevanz besitzt (Johnson et al., 2009; Tomé et al., 2012). Ob Unterschiede in der Entwicklungsbiologie, vor allem in der Art und Weise der Entwicklung im Endwirt (Barta et al., 2012), durch die im Dendrogramm ermittelten Beziehungen dargestellt werden, kann derzeit nicht entschieden werden, da für die meisten Arten der Entwicklungszyklus und die Vektorspezies unbekannt sind.

3.2. Morphologie der erythrozytären Stadien im Vergleich mit den erhaltenen Sequenzen

In der vorliegenden Untersuchung wurde keine Korrelation zwischen den von HALLA (2015) gefundenen Morphotypen und den im Rahmen dieser Dissertation erhaltenen Hämogregarinen-Sequenzen nachgewiesen. So wurden bei einigen Tieren mit unterschiedlichen Morphotypen identische Sequenzen erhalten.

Diese Tatsache lässt zwei mögliche Schlussfolgerungen zu. Entweder die Hämogregarinen einer Art können in unterschiedlichen Morphotypen vorliegen oder es lagen bei den Reptilienspezies, bei denen mehrere Morphotypen gefunden wurden, Mischinfektionen mit mehreren unterschiedlichen Hämogregarinenarten vor, es wurde in der PCR aber zufällig nur die DNA einer Art stark amplifiziert. Es konnte also nicht geklärt werden, ob die einzelnen

Morphotypen unterschiedliche Hämogregarinen-Arten repräsentieren oder vielleicht lediglich unterschiedliche Entwicklungszustände der Gamonten in den Erythrozyten darstellen. Die Tatsache, dass bei einigen Reptilien offensichtlich Mischsequenzen vorlagen, stützt jedoch die These, dass die unterschiedlichen Morphotypen möglicherweise unterschiedliche Arten darstellen.

Zur Klärung dieser Frage müssten zusätzliche, weiterführende Methoden, wie z.B. "deep sequencing" (Quiñones-Mateu et al., 2014) angewandt werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Hämogregarinen sind einzellige Blutparasiten, die dem Stamm Apikomplexa angehören. Sie haben einen zwei- bis dreiwirtigen Entwicklungszyklus. Dabei findet im Reptilienwirt die Merogonie und Gamogonie und in einem Invertebraten die Sporogonie statt. Reptilien bilden daher den Zwischenwirt der Parasiten, während Invertebraten als Endwirte fungieren. Bei Reptilien wurden die Gattungen *Haemogregarina*, *Hepatozoon*, *Karyolysus* und *Hemolivia* und hier etwa 400 Arten beschrieben. Die Gattungs- und Artzuordnung erfolgte häufig aufgrund morphologischer Eigenschaften der intraerythrozytären Stadien unter Einbeziehung der Wirbeltierart. Die Eignung dieser Parameter für eine Gattungs- und Artdiagnose ist allerdings umstritten, da sich die Parasitenstadien, die sich in den Erythrozyten der Reptilien befinden anhand ihrer Morphologie nur schwer unterscheiden lassen.

Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit ein molekularbiologischer Ansatz zur Differenzierung der Hämogregarinen aus Blutproben von frisch nach Deutschland importierten Reptilien gewählt. Als Zielsequenz wurde das 18S rRNA-Gen ausgewählt. Es wurden drei verschiedene, der Literatur entnommene, hämogregarinenspezifische Primerpaare verwendet (HEMO1/HEMO2 (Perkins und Keller, 2001), HepF300/Hep900 (Ujvari et al., 2004) und A mod/ 18AP1488R (Medlin et al., 1988; Wozniak et al., 1994)).

In die Untersuchung einbezogen wurden Blutproben aus 13 Königspythons (*Python regius*), 23 grünen Hundskopfschlingern (*Corallus caninus*), sieben westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten (*Pelusios castaneus*) und einem Tokeh (*Gekko gecko*). Drei partielle 18S rDNA-Sequenzen aus *Python regius*, neun Sequenzen aus *Corallus caninus* und zwei Sequenzen aus *Pelusios castaneus* wurden in die Sequenzanalysen einbezogen.

Nur eine aus einem Königspython erhaltene Sequenz konnte einer bereits in der NCBI-Genbank vorhandenen Sequenz zugeordnet werden, und zwar einer *Hepatozoon* sp. aus einer Sandrennnatter. Alle anderen erhaltenen Sequenzen unterschieden sich von bereits in der Genbank vorhandenen Sequenzen, so dass keine eindeutige Artzuordnung möglich war und es sich offensichtlich um bisher nicht molekularbiologisch beschriebene Arten handelt.

Die aus den Schlangen (*Python regius* und *Corallus caninus*) erhaltenen Sequenzen ordneten sich in einem phylogenetischen Stammbaum innerhalb der Gattung *Hepatozoon* sp. ein, bildeten dort aber unterschiedliche Gruppen, so dass das Vorkommen unterschiedlicher Arten gefolgert wurde. Die beiden Sequenzen aus den westafrikanischen Klappbrust-Pelomedusenschildkröten bildeten eine der Gattung *Haemogregarina* benachbarte Gruppe, zeigten aber auch enge Verwandtschaft mit *Hepatozoon*. Ihre taxonomische Einordnung konnte daher nicht eindeutig geklärt werden.

Es konnte gezeigt werden, dass mit importierten Reptilien eine Vielzahl an Hämogregarinenspezies nach Deutschland eingeführt wurde, die molekularbiologisch charakterisiert wurden. Da die eindeutige Identifizierung dieser Parasiten eine Voraussetzung für Untersuchungen zur Pathogenität von Hämogregarinen bei Reptilien und zu ihrer Therapie darstellt, bilden die durchgeführten Untersuchungen eine wichtige Grundlage für entsprechende weiterführende Studien.

VII. SUMMARY

Hemogregarines are protozoan blood parasites, belonging to the phylum Apicomplexa. They have a life cycle which includes two or three hosts. The merogony and gamogony takes place in the reptile host and the sporogony takes place in an invertebrate host. Therefore reptiles always represent intermediate hosts, while invertebrates act as definitive hosts. In reptiles, the genera *Haemogregarina*, *Hepatozoon*, *Karyolysus* and *Hemolivia* have been described including about 400 different species in reptiles. Most of the genera and species have been described based only on morphological characteristics and the reptilian host species. However, usefulness of these features for genus or species diagnosis is currently under debate. The parasite stages that are located in the erythrocytes of reptiles can, however, very often not be distinguished by their morphology.

In the present study, therefore, a molecular biological approach was chosen to distinguish the hemogregarines from blood samples of reptiles, which were recently imported to Germany. Blood samples, which had been previously found to contain hemogregarines by microscopical investigation, were included in the investigation.

As a target sequence the 18S rRNA gene was chosen. Using three different primer pairs HEMO1/HEMO2 (Perkins and Keller, 2001), HepF300/Hep900 (Ujvari et al., 2004) and A mod / 18AP1488.R (Medlin et al., 1988; Wozniak et al., 1994). PCR amplification was performed and phylogenetic analyses were based on the sequences obtained directly from the PCR amplification products.

Blood samples from 13 ball pythons (*Python regius*), 23 emerald tree boas (*Corallus caninus*), seven African mud turtles (*Pelusios castaneus*) and one tokay gecko (*Gekko gecko*) were analysed. Three sequences from ball pythons, nine different sequences from emerald tree boas, and two sequences from African mud turtles could be obtained. Only one of these sequences was completely identical with one of the sequences available at the NCBI genbank originating from a *Hepatozoon* sp. from an elegant sand racer (*Psammophis elegans*). The remaining sequences thus seem to be first molecular description and characterisations of hemogregarines.

In a phylogenetic tree the sequences obtained from the snakes clustered with *Hepatozoon* sp. but formed several separated groups indicating the existence of several species. The sequences obtained from parasites of the African mud turtles formed a sister clade to *Haemogregarina* sp. but were also close to species described as *Hepatozoon* sp. The formation of this clade was not supported by high bootstrap values. The taxonomic position thus seems to be unsolved.

The present study shows that a variety of hemogregrine species have been introduced into Germany via imported reptiles. Using molecular methods most hemogregarines detected here were unequivocally characterized for the first time. Since the exact identification is fundamental for determination of pathogenicity of these hemogregarines in reptiles and for the development of a therapy, this study represents an important prerequisite for future investigations.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Anonym; NCBI; from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Anonym; "The Nobel Prize in Chemistry 1993" Nobelprize.org; from http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1993/

Anonym; Taxonomic Databases Working Group; from <http://www.tdwg.org/>

Anonym; 1973. CITES; from <http://www.cites.org/eng/disc/text.php>

Anonym; 1996. EU-Artenschutzverordnung; from <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/consleg/1997/R/01997R0338-20050822-de.pdf>

Anonym 1997. Gutachten über die Mindestanforderungen an die Haltung von Reptilien (BMELV).

Anonym; 2005. Bundesartenschutzverordnung Anlage 5; from http://www.gesetze-im-internet.de/bartschv_2005/anlage_5_30.html

Anonym 2010. CITES-Jahresstatistik 2010 (BfN).

Anonym 2011. CITES Jahresstatistik 2011 (BfN).

Anonym 2012a. CITES-Jahresstatistik 2012 (BfN).

Anonym 2012b. Der Deutsche Heimtiermarkt 2011/2012 (Zentralverband Zoologischer Fachbetriebe).

Anonym 2013. CITES-Jahresstatistik 2013 (BfN).

Atwood, J.G., Goven, L.M., Leath, R., Margoulies, M., Miles, C., Mossa, A.C., Ragusa, R.P., Williams, F., Woudenberg, T.M.; 1995. Thermal cycler for automatic performance of the polymerase chain reaction with close temperature control; from <http://www.google.de/patents/US5475610>

Auliya, M. 2003. Hot Trade in cool creatures- A review of the live reptile trade in the European Union in the 1990s with a focus on Germany (TRAFFIC Europe).

Auliya, M., Schmitz, A.; 2010. Python regius; from <http://www.iucnredlist.org/details/177562/0>

Ball, G.H., 1967. Some blood sporozoans from East African reptiles. *Journal of Protozoology* 14, 198-210.

Ball, G.H., Chao, J., 1973. The complete development of the sporogonous stages of *Hepatozoon rarefaciens* cultured in a *Culex pipiens* cell line. *Journal of Parasitology* 59, 513-515.

Ball, G.H., Chao, J., Telford, S.R., Jr., 1967. The life history of *Hepatozoon rarefaciens* (Sambon and Seligmann, 1907) from *Drymarchon corais* (Colubridae), and its experimental transfer to *Constrictor constrictor* (Boidae). *Journal of Parasitology* 53, 897-909.

Ball, G.H., Chao, J., Telford, S.R., Jr., 1969. *Hepatozoon fusifex* sp. n., a hemogregarine from *boa constrictor* producing marked morphological changes in infected erythrocytes. *Journal of Parasitology* 55, 800-813.

Barta, J.R., Ogedengbe, J.D., Martin, D.S., Smith, T.G., 2012. Phylogenetic Position of the Adeleorinid Coccidia (Myzozoa, Apicomplexa, Coccidia, Eucoccidiorida, Adeleorina) Inferred Using 18S rDNA Sequences. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 59, 171-180.

Bashtar, A.R., Boulos, R., Mehlhorn, H., 1984a. *Hepatozoon aegypti* nov. sp. *Parasitology Research* 70, 29-41.

Bashtar, A.R., Ghaffar, F.A., Mehlhorn, H., 1984b. *Hepatozoon aegypti* nov. sp. *Parasitology Research* 70, 53-65.

Baur, G., 1887. On the phylogenetic arrangement of the Sauropsida. *Journal of Morphology* 1, 93-104.

Benett, W.J., Richards, J.B.; 2003. PCR thermocycler; from <http://www.google.com/patents/US6503750>

Benton, M.J., 1990. Phylogeny of the major tetrapod groups: morphological data and divergence dates. *Journal of Molecular Evolution* 30, 409-424.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L., Stryer, L., Häcker, B., Held, A., 2007. Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, 1153 p.

Bhushan, B.S., R.A. 2007. Gecko Feet: Natural Attachment Systems for Smart Adhesion. In Applied Scanning Probe Methods VII (Springer Berlin Heidelberg), pp. 41-76.

Birrer, L., Moser, R. 1998. Thermal cyclers (Google Patents).

Booden, T., Chao, J., Gordon, H.B., 1970. Transfer of *Hepatozoon* sp. from *Boa constrictor* to a Lizard, *Anolis carolinensis*, by Mosquito Vectors. Journal of Parasitology 56, 832-833.

Bouma, M.J., Smallridge, C.J., Bull, C.M., Komdeur, J., 2007. Susceptibility to infection by a haemogregarine parasite and the impact of infection in the Australian sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. Parasitology Research 100, 949-954.

Broghammer, S., 2012. Python regius: Atlas der Farbmorphen. NTV Natur und Tier-Verlag.

Brown, G.P., Brooks, R.J., Siddall, M.E., Dessler, S.S., 1994. Parasites and Reproductive Output in the Snapping Turtle, *Chelydra serpentina*. Copeia 1994, 228-231.

Brown, G.P., Shilton, C.M., Shine, R., 2006. Do parasites matter? Assessing the fitness consequences of haemogregarine infection in snakes. Canadian Journal of Zoology 84, 668-676.

Brown, R.M., Oliveros, C.H., Cameron, D.S., Diesmos, A.C., 2008. A New Gekko from the Babuyan Islands, Northern Philippines. Herpetologica 64, 305-320.

Campbell, T.W., Ellis, C.K., 2007. Avian and exotic animal hematology and cytology, 3rd ed. Edition. Blackwell, Ames, Iowa, IX, 287 S. pp.

Chien, A., Edgar, D.B., Trela, J.M., 1976. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. Journal of Bacteriology 127, 1550-1557.

Coborn, J., 1995. Boas & Pythons und andere ungiftige Schlangen. Bede Verlag GmbH.

Cook, C.A., Lawton, S.P., Davies, A.J., Smit, N.J., 2014. Reassignment of the land tortoise haemogregarine *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) to the genus *Hepatozoon* Miller 1908 (Adeleorina: Hepatozoidae) based on parasite morphology, life cycle and phylogenetic analysis of 18S rDNA sequence fragments. *Parasitology* 141, 1611-1620.

Cook, C.A., Smit, N.J., Davies, A.J., 2009. A redescription of *Haemogregarina fitzsimonsi* Dias, 1953 and some comments on *Haemogregarina parvula* Dias, 1953 (Adeleorina: Haemogregarinidae) from southern African tortoises (Cryptodira: Testudinidae), with new host data and distribution records. *Folia Parasitologica* 56, 173-179.

Criado-Fornelio, A., Rey-Valeiron, C., Buling, A., Barba-Carretero, J., Jefferies, R., Irwin, P., 2007. New advances in molecular epizootiology of canine hematic protozoa from Venezuela, Thailand and Spain. *Veterinary Parasitology* 144, 261-269.

Criado-Fornelio, A., Ruas, J.L., Casado, N., Farias, N.A.R., Soares, M.P., Müller, G., Brum, J.G.W., Berne, M.E.A., Buling-Saraña, A., Barba-Carretero, J.C., 2006. New molecular data on mammalian hepatozoon species (apicomplexa: adeleorina) from brazil and spain. *Journal of Parasitology* 92, 93-99.

Danilewsky, B., 1884. Die Hämatozoën der Kaltblüter. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* 24, 588-598.

Dvoráková, N., Kvicerová, J., Papoušek, I., Javanbakht, H., Tiar, G., Kami, H., Široky, P., 2014. Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*, *Mauremys*) are conspecific with *Haemogregarina stepanowi* Danilewsky, 1885. *Parasitology* 141, 522-530.

Ernst, C., H ; Barbour, Roger, W., 1989. Turtles of the world. Smithsonian Institution Scholarly Press;.

Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the

bootstrap. *Evolution* 39, 783-791.

Feng, D.F., Doolittle, R.F., 1987. Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *Journal of Molecular Evolution* 25, 351-360.

Freeman, B., Smith, N., Curtis, C., Hockett, L., Mill, J., Craig, I.W., 2003. DNA from Buccal Swabs Recruited by Mail: Evaluation of Storage Effects on Long-Term Stability and Suitability for Multiplex Polymerase Chain Reaction Genotyping. *Behavior Genetics* 33, 67-72.

Fritz, U.H., Peter, 2007. Checklist of Chelonians of the World. *Vertebrate Zoology* 57, 149-368.

Girling, S., Raiti, P., 2004. BSAVA manual of reptiles. British Small Animal Veterinary Association.

Haklová-Kočíková, B., Hižňanova, A., Majlát, I., Račk, K., Harris, D., Földvári, G., Tryjanowski, P., Kokošová, N., Malčeková, B., Majláthová, V., 2014. Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* inverted question mark a neglected but common parasite infecting some European lizards. *Parasites & Vectors* 7, 555.

Haklová, B., Majláthová, V., Majláth, I., Harris, D. J., Petrilla, V., Litschka-Koen, T., Petko, B., Oros, M., 2013. Phylogenetic relationship of Hepatozoon blood parasites found in snakes from Africa, America and Asia. *Parasitology* 141, 389-398.

Halla, U., 2015. Untersuchungen zum Blutparasitenstatus importierter Reptilien. Vet. med. Dissertation. LMU München.

Halla, U., Korbel, R., Mutschmann, F., Rinder, M., 2014. Blood parasites in reptiles imported to Germany. *Parasitology Research* 113, 4587-4599.

Harris, D.J., Graciá, E., Jorge, F., Maia, J.P.M.C., Perera, A., Carretero, M.A., Giménez, A., 2013. Molecular Detection of *Hemolivia* (Apicomplexa: Haemogregarinidae) from Ticks of North African *Testudo graeca* (Testudines: Testudinidae) and an Estimation of Their Phylogenetic Relationships Using 18S

rRNA Sequences. *Comparative Parasitology* 80, 292-296.

Harris, D.J., Maia, J.P.M.C., Perera, A., 2011. Molecular characterization of Hepatozoon species in reptiles from the Seychelles. *Journal of Parasitology* 97, 106-110.

Henderson, R.W., 1993. *Corallus caninus*. Catalogue of American Amphibians and Reptiles, 1-4.

Henkel, F.W., Schmidt, W., 2003. Geckos: Biologie, Haltung und Zucht. Ulmer Eugen Verlag, 175 p.

Hoff, G.L., 1984. Diseases of amphibians and reptiles. Plenum Pr., New York u.a., IX, 784 S. : Ill. pp.

Innis, M.A., Myambo, K.B., Gelfand, D.H., Brow, M.A., 1988. DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 85, 9436-9440.

Johnson, E.M., Panciera, R.J., Allen, K.E., Sheets, M.E., Beal, J.D., Ewing, S.A., Little, S.E., 2009. Alternate Pathway of Infection with *Hepatozoon americanum* and the Epidemiologic Importance of Predation. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23, 1315-1318.

Labbé, A., 1899. Sporozoa, In: *Das Tierreich*. Friedländer, Berlin, p. 180

Lainson, R., de Souza, M.C., Franco, C.M., 2003. Haematozoan parasites of the lizard *Ameiva ameiva* (Teiidae) from Amazonian Brazil: a preliminary note. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 1067-1070.

Lainson, R., De Souza, M.C., Franco, C.M., 2007. Natural and experimental infection of the lizard *Ameiva ameiva* with *Hemolivia stellata* (Adeleina: Haemogregarinidae) of the toad *Bufo marinus*. *Parasite* 14, 323-328.

Landau, I., Michel, J.C., Chabaud, A.G., Brygoo, E.R., 1972. Cycle biologique d'*Hepatozoon domerguei*; discussion sur les caractères fondamentaux d'un cycle de Coccidie. *Parasitology Research* 38, 250-270.

Li, J., Wirtz, R.A., McConkey, G.A., Sattabongkot, J., Waters, A.P., Rogers, M.J., McCutchan, T.F., 1995. Plasmodium: genus-conserved primers for species identification and quantitation. *Exp Parasitol* 81, 182-190.

Madsen, T., Ujvari, B., Olsson, M., 2005. Old pythons stay fit; effects of haematozoan infections on life history traits of a large tropical predator. *Oecologia* 142, 407-412.

Maia, J.P., Harris, D.J., Perera, A., 2011. Molecular survey of Hepatozoon species in lizards from North Africa. *Journal of Parasitology* 97, 513-517.

Majláthová, V., Majláth, I., Haklová, B., Hromada, M., Ekner, A., Antczak, M., Tryjanowski, P., 2010. Blood parasites in two co-existing species of lizards (*Zootoca vivipara* and *Lacerta agilis*). *Parasitology Research* 107, 1121-1127.

Mathew, J.S., Bussche, R.A.V.D., Ewing, S.A., Malayer, J.R., Latha, B.R., Panciera, R.J., 2000. Phylogenetic relationships of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life-cycle characters. *Journal of Parasitology* 86, 366-372.

Mebs, D., 1965. On a finding of Haemogregarina sp. in the African turtle *Testudo angulata*. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 72, 180-181.

Medlin, L., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L., 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. *Gene* 71, 491-499.

Mehlhorn, H., 2008. *Encyclopedia of Parasitology: A-M*. Springer, 1573 p.

Mihalca, A., Achelaritei, D., Popescu, P., 2002. Haemoparasites of the genus *Haemogregarina* in a population of European pond turtles (*Emys orbicularis*) from Drăgășani, Vâlcea county, Romania. *Scientia Parasitologica* 2, 22-27.

Miyamoto, M., Mello, M.L.S., 2007. Chromatin supraorganization, DNA fragmentation, and cell death in erythrocytes of the rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae), infected with the protozoan, *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae). *Cell Biology International* 31, 494-499.

Moco, T.C., O'Dwyer, L.H., Vilela, F.C., Barrella, T.H., da Silva, R.J., 2002. Morphologic and morphometric analysis of *Hepatozoon* spp. (Apicomplexa, Hepatozoidae) of snakes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 97, 1169-1176.

Modesto, S.P., Anderson, J.S., 2004. The phylogenetic definition of Reptilia. *Systematic biology* 53, 815-821.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology* 51 Pt 1, 263-273.

Mullis, K.B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262, 56-61, 64-55.

Mutschmann, F., 2002. Parasiten des Blutes bei Reptilien. *Praktischer Tierarzt* 82, 136-144.

Mutschmann, F., 2006. Parasitosen der Reptilien, In: Schnieder, T. (Ed.) *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Parey, Stuttgart, pp. 739-769.

Mutschmann, F., 2010. *Erkrankungen der Amphibien*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 322 p.

O'Shea, M., Halliday, T., 2007. *Reptilien & Amphibien über 400 Arten aus aller Welt*. Dorling Kindersley, München, 256 p.

Oppliger, A., Clobert, J., 1997. Reduced tail regeneration in the Common Lizard, *Lacerta vivipara*, parasitized by blood parasites. *Functional Ecology* 11, 652-655.

Paperna, I., 2006. *Hemolivia mauritanica* (Haemogregarinidae: Apicomplexa) infection in the tortoise *Testudo graeca* in the Near East with data on sporogonous development in the tick vector *Hyalomma aegyptium*. *Parasite* 13, 267-273.

Paperna, I., Smallridge, C.J., 2001. Ultrastructure of developmental stages of *Hemolivia mariae* (Apicomplexa: Haemogregarinidae), natural parasite of the Australian sleepy lizard, in experimentally infected deviant hosts. *Folia Parasitologica* 48, 255-262.

Perkins, S.L., Keller, A.K., 2001. Phylogeny of nuclear small subunit rRNA genes of hemogregarines amplified with specific primers. *Journal of Parasitology* 87, 870-876.

Perkins, S.L., Osgood, S.M., Schall, J.J., 1998. Use of PCR for detection of subpatent infections of lizard malaria: implications for epizootiology. *Molecular Ecology* 7, 1587-1590.

Petit, G., Landau, I., Baccam, D., Lainson, R., 1990. Description et cycle biologique d'*Hemolivia stellata* n. g., n. sp., hémogregarine de crapauds bresiliens. *Annales de parasitologie humaine et comparée* 65, 3-15.

Pienaar, U.d.V., 1962. Haematology of some South African reptiles. Witwatersrand University Press, Johannesburg, 298 p.

Quiñones-Mateu, M.E., Avila, S., Reyes-Teran, G., Martinez, M.A., 2014. Deep sequencing: Becoming a critical tool in clinical virology. *Journal of Clinical Virology* 61, 9-19.

Raeymaekers, L., 1993. Quantitative PCR: theoretical considerations with practical implications. *Analytical biochemistry* 214, 582-585.

Reichenow, E., 1921. Die Hämococcidien der Eidechsen: Vorbemerkungen und I. Teil: Die Entwicklungsgeschichte von Karyolysus. *Archiv für Protistenkunde* 42, 179 - 291.

Rollo, F., Amici, A., Salvi, R., 1988. A simple and low cost DNA amplifier. *Nucleic Acids Research* 16, 3105-3106.

Romer, J.D., 1951. The Occurrence of the Lizard *Gekko gekko* in the Colony of Hong Kong. *Copeia* 1951, 80.

Rooney, A.P., 2004. Mechanisms underlying the evolution and maintenance of functionally heterogeneous 18S rRNA genes in apicomplexans. *Molecular biology and evolution* 21, 1704-1711.

Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution* 4, 406-425.

Salomon, F.V., Geyer, H., Gille, U., 2008. Anatomie für die Tiermedizin, 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Enke, 896 p.

Sambon, L.W., Seligmann, C.G., 1907. The hemogregarines of snakes. Transactions of the Pathological Society of London 58, 310-370.

Schochetman, G., Ou, C.-Y., Jones, W.K., 1988. Polymerase Chain Reaction. The Journal of Infectious Diseases 158, 1154-1157.

Siddall, M.E., 1995. Phylogeny of Adeleid Blood Parasites with a Partial Systematic Revision of the Haemogregarine Complex. Journal of Eukaryotic Microbiology 42, 116-125.

Siddall, M.E., Desser, S.S., 1991. Merogonic Development of *Haemogregarina balli* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the Leech *Placobdella ornata* (Glossiphoniidae), Its Transmission to a Chelonian Intermediate Host and Phylogenetic Implications. Journal of Parasitology 77, 426-436.

Siddall, M.E., Desser, S.S., 2001. Transmission of *Haemogregarina balli* from painted turtles to snapping turtles through the leech *Placobdella ornata*. Journal of Parasitology 87, 1217-1218.

Sipos, R., Székely, A.J., Palatinszky, M., Révész, S., Márialigeti, K., Nikolausz, M., 2007. Effect of primer mismatch, annealing temperature and PCR cycle number on 16S rRNA gene-targeting bacterial community analysis. FEMS Microbiology Ecology 60, 341-350.

Siroky, P., Kamler, M., Frye, F.L., Fictum, P., Modry, D., 2007. Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental infection. Folia Parasitologica 54, 13-18.

Siroky, P., Kamler, M., Modry, D., 2004. Long-term occurrence of *Hemolivia cf. mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in captive *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence for cyclic merogony? Journal of Parasitology 90, 1391-1393.

Sloboda, M., Kamler, M., Bulantova, J., Votypka, J., Modry, D., 2007. A new species of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) from *Python regius* (Serpentes: Pythonidae) and its experimental transmission by a mosquito vector. *Journal of Parasitology* 93, 1189-1198.

Sloboda, M., Kamler, M., Bulantova, J., Votypka, J., Modry, D., 2008. Rodents as intermediate hosts of *Hepatozoon ayorgbor* (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) from the African ball python, *Python regius*? *Folia Parasitologica* 55, 13-16.

Smallridge, C.J., Bull, C.M., 2001. Infection dynamics of *Hemolivia mariae* in the sleepy lizard *Tiliqua rugosa*. *Parasitology Research* 87, 657-661.

Smith, T.G., 1996. The genus *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleina). *Journal of Parasitology* 82, 565-585.

Smith, T.G., Desser, S.S., Martin, D.S., 1994. The development of *Hepatozoon sipedon* sp. nov. (Apicomplexa: Adeleina: Hepatozoidae) in its natural host, the Northern water snake (*Nerodia sipedon sipedon*), in the culicine vectors *Culex pipiens* and *C. territans*, and in an intermediate host, the Northern leopard frog (*Rana pipiens*). *Parasitology Research* 80, 559-568.

Smith, T.G., Kim, B., Desser, S.S., 1999. Phylogenetic relationships among *Hepatozoon* species from snakes, frogs and mosquitoes of Ontario, Canada, determined by ITS-1 nucleotide sequences and life-cycle, morphological and developmental characteristics. *International Journal for Parasitology* 29, 293-304.

Stadhouders, R., Pas, S.D., Anber, J., Voermans, J., Mes, T.H.M., Schutten, M., 2010. The Effect of Primer-Template Mismatches on the Detection and Quantification of Nucleic Acids Using the 5' Nuclease Assay. *Journal of Molecular Diagnostics* 12, 109-117.

Strohlein, D.A., Christensen, B.M., 1984. *Haemogregarina* sp. (Apicomplexa: Sporozoea) in Aquatic Turtles from Murphy's Pond, Kentucky. *Transactions of the American Microscopical Society* 103, 98-101.

Svahn, K., 1974. Incidence of Blood Parasites of the Genus *Karyolysus* (Coccidia) in Scandinavian Lizards. *Oikos* 25, 43-53.

Tasch, H.K., Bernd 2008. Thermocycler (europäisches Patentamt).

Telford Jr, S.R., Ernst, J.A., Clark, A.M., Butler, J.F., 2004. *Hepatozoon sauritus*: a polytopic hemogregarine of three genera and four species of snakes in north Florida, with specific identity verified from genome analysis. *Journal of Parasitology* 90, 352-358.

Telford Jr., S.R., 2010. Three new *Hepatozoon* species (Apicomplexa: Hepatozoidae) infecting the Florida kingsnake, *Lampropeltis getula floridana*. *Journal of Parasitology* 96, 162-169.

Telford, S.R., 2008. Hemoparasites of the Reptilia: color atlas and text. CRC Press, 376 p.

Tenter, A., Schnieder, T., 2006. Erreger von Parasitosen: Taxonomie, Systematik und allgemeine Merkmale, In: Veterinärmedizinische Parasitologie. Parey, Stuttgart, pp. 26-73.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Tome, B., Maia, J.P., Harris, D.J., 2013. Molecular assessment of apicomplexan parasites in the snake *Psammophis* from North Africa: do multiple parasite lineages reflect the final vertebrate host diet? *Journal of Parasitology* 99, 883-887.

Tomé, B., Maia, J.P.M.C., Harris, D.J., 2012. *Hepatozoon* Infection Prevalence in Four Snake Genera: Influence of Diet, Prey Parasitemia Levels, or Parasite Type? *Journal of Parasitology* 98, 913-917.

Trutnau, L., 2002. Schlangen im Terrarium. 1. Ungiftige Schlangen. Ulmer Eugen Verlag.

Uetz, P.; Higher Taxa in Extant Reptiles in The Reptile Database; from <http://www.reptile-database.org/db-info/taxa.html>

Uetz, P.; *Pelusios castaneus* in The Reptile Database; from http://reptile-database.reptarium.cz/species?genus=Pelusios&species=castaneus&search_param=%28%28taxon%3D%27Pelomedusidae%27%29%29

Uetz, P.; The Reptile Database; from <http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>

Uetz, P.; 2000. Worldwide Diversity of Reptiles in The Reptile Database; from <http://www.reptile-database.org/db-info/diversity.html>

Ujvari, B., Madsen, T., Olsson, M., 2004. High Prevalence of *Hepatozoon spp.* (Apicomplexa, Hepatozoidae) Infection in Water Pythons (*Liasis fuscus*) from Tropical Australia. Journal of Parasitology 90, 670-672.

Valones, M.A., Guimaraes, R.L., Brandao, L.A., de Souza, P.R., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., Crovela, S., 2009. Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields: a review. Brazilian Journal of Microbiology 40, 1-11.

Vilcins, I.-M.E., Ujvari, B., Old, J.M., Deane, E., 2009. Molecular and morphological description of a *Hepatozoon* species in reptiles and their ticks in the Northern Territory, Australia. Journal of Parasitology 95, 434-442.

Vosberg, H.-P., 1989. The polymerase chain reaction: an improved method for the analysis of nucleic acids. Human Genetics 83, 1-15.

Walls, J.G., Walls, M.M., 1999. Geckos: Pflegen und Züchten im Terrarium. bede-Verl., Ruhmannsfelden, 64 S. : p.

Wilbur, W.J., Lipman, D.J., 1983. Rapid similarity searches of nucleic acid and protein data banks. Proceedings of the Nationall Academy of Science of the United States of America 80, 726-730.

Wozniak, E.J., Kanitz, C., Homer, B., Kreisle, R., Telford Jr, S.R., McLaughlin, G., 1996a. Demonstration of common and stage-specific anti-*Hepatozoon mocassini* antibodies in experimentally infected unnatural lizard hosts. International Journal for Parasitology 26, 131-133.

Wozniak, E.J., Kazacos, K.R., Telford Jr, S.R., McLaughlin, G.L., 1996b. Characterization of the clinical and anatomical pathological changes associated with *Hepatozoon mocassini* infections in unnatural reptilian hosts. International Journal for Parasitology 26, 141-146.

Wozniak, E.J., Telford Jr, S.R., 1991. The fate of Hepatozoon species naturally infecting florida black racers and watersnakes in potential mosquito and soft tick vectors, and histological evidence of pathogenicity in unnatural host species. International Journal for Parasitology 21, 511-516.

Wozniak, E.J., Telford Jr, S.R., McLaughlin, G.L., 1994. Employment of the Polymerase Chain Reaction in the Molecular Differentiation of Reptilian Hemogregarines and Its Application to Preventative Zoological Medicine. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 25, 538-547.

Wu, Z., Tsumura, Y., Blomquist, G., Wang, X.-R., 2003. 18S rRNA gene variation among common airborne fungi, and development of specific oligonucleotide probes for the detection of fungal isolates. Applied and environmental microbiology 69, 5389-5397.

Yokota, M., Tatsumi, N., Nathalang, O., Yamada, T., Tsuda, I., 1999. Effects of heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. Journal of clinical laboratory analysis 13, 133-140.

IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1:Taxonomie der Hämogregarinen	5
ABBILDUNG 2: schematische Übersicht des Lebenszyklus von <i>Karyolysus</i> <i>lacertae</i>	7
ABBILDUNG 3: schematische Übersicht über den Entwicklungszyklus von <i>Hepatozoon sipedon</i>	12
ABBILDUNG 4: Entwicklungszyklus von <i>Haemogregarina balli</i>	14
ABBILDUNG 5: Kopfportrait eines Königspythons mit Labialgruben.....	24
ABBILDUNG 6: schematischer Ablauf eines Zykluses der Polymerasekettenreaktion	29
ABBILDUNG 7: Westafrikanische Klappbrust-Pelomedusenschildkröte (<i>Pelusios castaneus</i>) bei der Untersuchung.....	33
ABBILDUNG 8: Königpython (<i>Python regius</i>) mit arttypischem Abwehrverhalten bei der Untersuchung	34
ABBILDUNG 9: Hundskopfschlinger (<i>Corallus caninus</i>) bei der Untersuchung	34
ABBILDUNG 10: Tokeh (<i>Gekko gecko</i>) bei der Untersuchung	34
ABBILDUNG 11: Königpython (<i>Python regius</i>); links: Befall mit Schildzeckenbefall , rechts: Hautwunde	44
ABBILDUNG 12: grüner Hundskopfschlinger (<i>Corallus caninus</i>) mit hochgradiger Stomatitis	44
ABBILDUNG 13: westafrikanische Klappbrust-Pelomedusenschildkröte (<i>Pelusios castaneus</i>); links: fehlende Krallen , rechts: Panzerläsion	44
ABBILDUNG 14: Tokeh (<i>Gekko gecko</i>); links: Schwellung der Zehe, rechts Unterkieferabszess.....	45
ABBILDUNG 15: Schematische Übersicht der bei Hämogregarinen	

gefundenen Morphotypen	47
ABBILDUNG 16: Gelelektrophorese nach PCR mit Primerpaar HEMO 1 und HEMO 2.....	49
ABBILDUNG 17: Gelelektrophorese nach PCR mit Primerpaar HepF300 und Hep900.....	50
ABBILDUNG 18: Gelelektrophorese nach PCR mit Primerpaar A mod und 18AP1488.R.....	51
ABBILDUNG 19: phylogenetischer Stammbaum basierend auf einer Neighbor-Joining-Analyse	65
ABBILDUNG 20: phylogenetischer Stammbaum einschließlich geografischer Herkunft der Wirbeltierwirte	68

X. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: Morphologie der intraerythrozytären Formen und	
Wirbeltierwirte einiger Hämogregarinenarten	15
TABELLE 2: Prävalenzen von Hämogregarinen-Befall auf der Basis von	
mikroskopischen Untersuchungen	46
TABELLE 3: Übersicht über Ergebnisse der PCRs und erhaltene	
Sequenzen	52
TABELLE 4: Übersicht über die Ergebnisse der Paarweisen Alignments der	
erhaltenen Sequenzen; Identität der Sequenzen in Prozent.....	56
TABELLE 5:Übersicht über die Ergebnisse der BLAST-Analyse	59
TABELLE 6: Vergleich der Morphologie der erythrozytären	
Parasitenstadien mit den erhaltenen Sequenzen	69

XI. ANHANG

Anhang I: Übersicht über untersuchte Tiere und Herkunftsland

Nr.	Tierart	Herkunftsland
49	<i>Python regius</i>	Togo
50	<i>Python regius</i>	Togo
51	<i>Python regius</i>	Togo
52	<i>Python regius</i>	Togo
53	<i>Python regius</i>	Togo
54	<i>Python regius</i>	Togo
55	<i>Python regius</i>	Togo
56	<i>Python regius</i>	Togo
57	<i>Python regius</i>	Togo
58	<i>Python regius</i>	Togo
59	<i>Python regius</i>	Togo
60	<i>Python regius</i>	Togo
61	<i>Python regius</i>	Togo
62	<i>Python regius</i>	Togo
63	<i>Python regius</i>	Togo
64	<i>Python regius</i>	Togo
65	<i>Python regius</i>	Togo
66	<i>Python regius</i>	Togo
67	<i>Python regius</i>	Togo
68	<i>Python regius</i>	Togo
93	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam

94	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
95	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
96	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
97	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
98	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
99	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
100	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
101	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
102	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
103	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
104	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
105	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
166	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
167	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
168	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
169	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
170	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
171	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
172	<i>Gekko gecko</i>	Vietnam
191	<i>Corallus caninus</i>	Französisch Guyana
193	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
194	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
195	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
196	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
197	<i>Corallus caninus</i>	Surinam

198	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
199	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
200	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
201	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
202	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
203	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
204	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
205	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
232	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
365	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
366	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
367	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
368	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
369	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
370	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
371	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
372	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
373	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
374	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
375	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
376	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
377	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
378	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
379	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo
380	<i>Pelusios castaneus</i>	Togo

395	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
396	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
397	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
398	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
399	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
400	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
401	<i>Corallus caninus</i>	Surinam
405	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
406	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
407	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
408	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
408	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
409	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
410	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
411	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
412	<i>Gekko gekko</i>	Vietnam
413	<i>Corallus caninus</i>	Surinam

Anhang II: erhaltene Sequenzen

Sequenz aus *Python regius* 52

GGAATTAGGGGTCAATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATC
 TAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAG
 GTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAA
 TGATAGAAATTTAAATACTTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTTAAATTTGTTGCAGT
 TAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTTTGTTAAAAATAACCGGTCTGCTTTTATTAAT
 AAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTTGAAATGTTTTTTA

CTTTATTGTAAAAAGCAATTTTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTT
TCAAGCAGGCTAACGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAATAGGATT
TTAGTTCTACGTTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATAGGAGCAGT
TGGGGGCATTTGTATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGA

Sequenz aus *Python regius* 55

AGCTTCTTAAAACCAATAACGTAGAACTAAAATCCTATNANATTATTCCATGC
TGCAGTATTCAAACGTTAGCCTGCTTGAAACACTCTAATTTTCTCAAAGNAA
AAATCCTGAAATTTGCTTTTTACAATAAAGTAAAAAACATTTCAAAGGACATTA
TTGCTAAAAACACACCAAGATACNACTTTTATTAATAAAAGCAAACCGGTTAT
TTTTAGCAAAAATTCAACTACGAGCTTTTAACTGCAACAATTTTAATATACTC
TATTGGAGCTGGAATTACCGNGNCTGCTGGCACCAGACNTGCCCTCCAATT
GATACTTTANAAAGNATTTNAATTTCTATCATTCCAATTACAAAGCATTNTAAC
TGCCTTG

Sequenz aus *Python regius* 66

ATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGC
AGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGCATAAGAGAGGTTAGTGACAAGAA
ATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAA
ATACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGCAGTTAAAAGCTCGTA
GTTGAATTTTTGTTAAAAATAACCGGTCTGCTTTTATTAATAAAAGTGGTATCT
TGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTTGAAATGTTTTTTACTTTATTGTAAAA
AGCAATTTTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGGCTA
ACGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAATAGGATTTTAGTTCTACGTT
ATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTGATAGGAGCAGTTGGGGGCATTTG
TATTTAACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGAGCCCCCT

Sequenz aus *Corallus caninus* 103

CGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAATAGCAAAAAG
AGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATT
GGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTG
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTG
CAGTTAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAGAAATAACCGGTTTGCTTTTA
TTAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTCTAGCAATAATGTTCTTTGAAATGT

TTTTTACTTAATTGTAAAAAGCACAAATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAG
AGTGTTTCAAGCAGGCTAACGTTTTGGATACTGCAGCATGGAATAATAAAAT
AGAATTTTAGTTTTACGTTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 104

ATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAA
GGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGAGAGGTA
GTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGA
TAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAATTGTTGCAGTTA
AAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTATTAATA
AAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGTTTTTA
CTTTATTGTAAGAAGCAATATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGT
TTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATAGGATT
TTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGGGCAGT
TGGGGGCATTTGTATTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 191

CGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGA
GAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAATTGTTGC
AGTTAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTAT
TAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGT
TTTTACTTTATTGTAAGAAGCAATATTCAGGATTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATA
GGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 194

TTTTGTTTCTGACCTATCAGCTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGC
AGTGACGGTTAACGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAG
AAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTC
TAATAGCAAAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAA

TGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTTAAAGTATCAATTGGA
GGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATA
TTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAGAAATAACC
GGTTTGCTTTTATTAATAAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTT
CTTTGAAATGTTTTTTACTTAATTGTAAAAAGCAAAATTCAGGATTTTTACTTT
GAGAAAATTAGAGTGTTTTAAGCAGGCTAACGTTTTGAATACTGCAGCATGG
AATAATAAAATAGGATTTTAGTTCTACGTTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAAT
GATTGATAGGGGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTA

Sequenz aus *Corallus caninus* 195

TCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAANGAAGGNA
GCAGGCGCGCAAATTACCNAATTCTAACAGTATAAGNNAGGTAGTGACAAG
AAATAACAGTACAAGGCAGTTAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTT
AAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGC
GGNAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTC
GTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCG

Sequenz aus *Corallus caninus* 196

CGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGA
GAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAATGCTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGC
AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTAT
TAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGT
TTTTACTTTATTGTAAGAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATA
GGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 198

CGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGA
GAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAATGCTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGC

AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTAT
TAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGT
TTTTACTTTATTGTAAGAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATA
GGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTAA

Sequenz aus *Corallus caninus* 200

TTTTGTTTCTGACCTATCAGCTTTTCGACGGTATGGTATTGGCTTACCGTGGC
AGTGACGGTTAACGGGGGATTTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGA
GAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATT
CTAACAGTATAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAA
ATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGG
AGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTAT
ATTAAAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAAC
CGGTGTGCTTTTATTAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATG
TCCTTAGAAATGGTTTTTACTTTATTGTAAGAAGCAATATTCAGGATTTTTACT
TTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCAT
GGAATAATAAAATAGGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTA
ATGATTAATAGGGGCAGTTGGGGGCATTTGTATTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 205

CGGGGGATTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGA
GAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAATTGTTGC
AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTAT
TAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGT
TTTTACTTTATTGTAAGAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATA
GGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 232

CGGGGGATTAGGGTTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA

CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGA
GAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGC
AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTAT
TAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGT
TTTTACTTTATTGTAAAAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAATA
GGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 395

TNGGGGCTTTGNNTTACTGTCAGAGGTGAAATTCTTAGATTTGTAAAGACA
CACTACTGCGAAAGCATTTGCCAAAGATGTTTTCATTAATCAAGAACGAAAG
TTAGGGGATCGAAGACGATCAGATACCGTCGTAGTCTTAACTATAAACTATG
CCGACTAGAGATTGGAGGTCGTCTTTATAAACGACTCCTTCAGCACCTTACA
AGAAATCAAAGTCTTTGGGTTCTGGGGGGAGTATGGTCGCAAGGCTGAAAC
TTAAAGGAATTGACGGAAGGGCACCACCAGGCGTGGAGCCTGCGGCTTAAT
TTGACTCAACACGGGAAAACCTCACCAGGTCCAGACATAGAAAGGATTGACA
GATTGACAGCTCTTTCTTAATTCTATGGGTGGTGGTGCATGGCCGTTCTTAG
TTGGTGGAGTGATTTGTCTGGTTAATTCCGTTAACGAACGAGACCTTAACCT
GCTAAATAGGGTTAAAAACCTTTGTTTTTTAAATTACTTCTTAGAAGGACTTT
GCGTGTCTAACGCAAGGAAGTTTGAGGCAATAACAGGTCTGTGATGCCCTT
AGATGTTCTGGGCTGCACGCGCGCTACAATGATGCATCCAACAAGTTTATAA
CCTTGTTGATAAGCTTAGGTAATCTTTTGAATGTGCATTGTGATGGGGATA
GATTATTGTAATTATTAATCTTTAACGAGGAATGCCTATTAAGCGCAAGTCNT
NAANTTGCGCTGATTAC

Sequenz aus *Corallus caninus* 396

AGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCA
AATTACCCAATTCTAATAGCAAAAGAGAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTAC
AAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAATTTAAATACTTTTTAA
AGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCT
CCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGCAGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCT
GCTAAAAATAACCGGTTTGCTTTTATTAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTT
CTAGCAATAATGTTCTTTGAAATGTTTTTTACTTAATTGTAAAAAGCACAAATTC

AGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTCAGCAGGCTAACGTTTTGGA
TACTGCAGCATGGAATAATAAAATAGAATTTTAGTTTTACGTTATTGGTTTTAA
GAACTAAATTAATGATTAATAGGGGCAGTTGGGGGCATTTGTATTTA

Sequenz aus *Corallus caninus* 397

TAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGG
AAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGAGAGGTAGT
GACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTGGAATGATA
GAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGCAGTTAAA
AAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTATTAATAAA
AGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGTTTTTACT
TTATTGTAAAAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTC
AAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATAGGATTTTG
GTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGGGCAGTTGG
GGGCATTTGTATTTA

Sequenz aus *Corallus caninus* 398

AGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAANNAGTTAAAATGCTTTGTAAT

Sequenz aus *Corallus caninus* 400

CGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGA
GAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAATAATTGTTGC
AGTTAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTAT
TAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGT
TTTTACTTTATTGTAAAAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATA
GGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTTAACT

Sequenz aus *Corallus caninus* 401

CGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGTATAAGA

GAGGTAGTGACAAGAAATAACAGTACAAGGCAGTTAAAATGCTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAATTGTTGC
AGTTAAAAAGCTCGTAGTTGAATTTCTGCTAAAAATAACCGGTGTGCTTTTAT
TAATAAAAGTGGTATCTTGGTGTGTTTTTAGCAATAATGTCCTTAGAAATGGT
TTTTACTTTATTGTAAGAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGA
GTGTTTCAAGCAGGCTAATGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATA
GGATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGG
GCAGTTGGGGGCATTTGTATTAACT

Sequenz aus *Pelusios castaneus* 373

CGGGGGATTAGGGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCTTGAGAAACGGCTACCA
CATCTAAGGAAGGCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATTCTAACAGGTTAAG
AGAGGTAGTGACAAGAAATAACAATACAAGGCAATTAATGTTTTGTAATTG
GAATGATAGAAATTTAAACACTTTTTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGC
AGTTGAAAAGCTCGTAGTTGGATTTCTGTAAAGATAACCGGTCTGCTTTTTA
ATTGAAGTGGTACCAGGTGTGTTTTTAGCATTAAATGTCCTATGAAGTGTTTTT
TACTTTATTGTTAGAAGCAATGTTTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGT
GTTTCAAGCAAGCTAACGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATAGG
ATTTTGGTTCTACATTATTGGTTTTAAGAATTAATTAATAATTAATAGGGACA
GTTGGGGGCATTTGTATTGACT

Sequenz aus *Pelusios castaneus* 376

GGTTCGATTCCGGAGAGGGAGCCTGAGAAACGGCTACCACATCTAAGGAAG
GCAGCAGGCGCGCAAATTACCCAATCCTAATAGCATAAGGGAGGTAGTGAC
AAGAAATAACAATACAAGGCAATTAATGCTTTGTAATTGGAATGATAGAAA
TTTAAACACTTTCTAAAGTATCAATTGGAGGGCAAGTCTGGTGCCAGCAGCC
GCGGTAATTCCAGCTCCAATAGCGTATATTAAAGTTGTTGCAGTTAAAAAGC
TCGTAGTTGAATTTCTGTAAAAATAACTGGTCTGCTTTACATTAAAGTGGTA
CCTTGGTGTGTTTTTAGCATTAAATGTCCTATGAAATGTTTTTTACTTTATTGTT
AAAAGCAATATTCAGGATTTTTACTTTGAGAAAATTAGAGTGTTTCAAGCAGG
CTAACGTTTTGAATACTGCAGCATGGAATAATAAAATAGGATTTTGGTTCTAC
ATTATTGGTTTTAAGAACTAAATTAATGATTAATAGGGACGGTTG

XII. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an dieser Stelle Herrn Professor Korbelt für die Überlassung dieses spannenden und interessanten Themas.

Danken möchte ich auch Dr. Frank Mutschmann, von dem die Idee zu dieser Dissertation stammt.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Monika Rinder für die tolle Betreuung und Bereitschaft, Tag und Nacht Fragen zu beantworten und hilfreich zur Seite zu stehen.

Außerdem möchte ich mich beim Team der Virologie, namentlich Lisa Koch und Marius Micheler für die freundliche Aufnahme, Hilfestellung bei der Laborarbeit und Bereitschaft, Fragen zu beantworten bedanken.

Des Weiteren danke ich Ursula Halla und Mark Eichelmann für die geleistete Vorarbeit, die Überlassung der Blutproben und tatkräftige Unterstützung beim Sammeln.

Ein besonderer Dank gilt den beiden Reptiliengroßimporteuren für die Möglichkeit, Blutproben von importierten Reptilien gewinnen und die stets freundliche Aufnahme, Bereitschaft zur Hilfe und der Möglichkeit sich frei in den jeweiligen Räumlichkeiten bewegen zu dürfen.

Auch möchte ich mich herzlich beim Institut für Parasitologie und Tropenmedizin der LMU München für die freundliche Bereitstellung der Positivkontrollen bedanken, ohne die die Durchführung der PCRs deutlich erschwert gewesen wäre.

Bedanken möchte ich mich auch bei meiner Familie, insbesondere bei meinen Eltern, ohne deren Unterstützung mir das Tiermedizinstudium und die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Und last but not least gilt mein Dank dem ganzen Team der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische für viele lehrreiche Stunden, fruchtbare Diskussionen und stets offene Ohren und Lösungsvorschläge, wenn einmal etwas nicht so klappte wie es sollte.