

Aus dem Department für Pathobiologie  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

(Departmentsprecher: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Armin Saalmüller)

Institut für Virologie

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Hans Tillmann Rügenapf)

**Entwicklung einer quantitativen Echtzeit PCR zum Nachweis des  
neuartigen Reptilien Nidovirus und Untersuchung der Verbreitung in  
Schlangen der Gattung *Morelia***

**DIPLOMARBEIT**

zur Erlangung der Würde eines Diplomtierarztes  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

**Jeff Schreiner**

Wien, Januar 2021

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. med. vet. Hans Tillmann Rümenapf  
Institut für Virologie  
Department für Pathobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Prof. Dr. med. vet. Benjamin Lamp  
Institut für Virologie  
FB Veterinärmedizin  
Justus-Liebig-Universität Gießen  
Deutschland

Betreuende Assistentin:

Dr.<sup>in</sup> med. vet. Kerstin Seitz  
Institut für Virologie  
Department für Pathobiologie  
Veterinärmedizinische Universität Wien

Begutachterin:

Univ.-Prof.<sup>in</sup> Dr.<sup>in</sup> med. vet. Alexandra Scope  
Institut für Interne Medizin Kleintiere  
Department für Kleintiere und Pferde  
Veterinärmedizinische Universität Wien

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Fragestellung .....</b>	<b>4</b>
1.1 <i>Grüner Baumpython (Morelia viridis)</i> .....	4
1.2 <i>RNA-Viren bei Reptilien</i> .....	6
1.3 <i>Taxonomie der Nidoviren</i> .....	7
1.4 <i>Nidoviren bei Reptilien</i> .....	9
1.5 <i>Klinische Ausprägung der Nidovirusinfektionen</i> .....	10
1.6 <i>Genomaufbau und Transkriptionsstrategie</i> .....	12
1.7 <i>Ziel der Studie</i> .....	15
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>17</b>
2.1 <i>Material</i> .....	17
2.1.1 <i>Auswahl der Tiere</i> .....	17
2.1.2 <i>Allgemeine Probenauswahl</i> .....	18
2.1.3 <i>Vorgegangene Untersuchungen der Zucht A</i> .....	19
2.1.4 <i>Gewinnung des Untersuchungsmaterials der Zucht A</i> .....	20
2.2 <i>Methoden</i> .....	21
2.2.1 <i>Primer</i> .....	21
2.2.2 <i>Verwendete Kits und Reagenzien</i> .....	21
2.2.3 <i>Probennahme und Transport</i> .....	22
2.2.4 <i>RNA Extraktion</i> .....	22
2.2.5 <i>RT-PCR</i> .....	23
2.2.6 <i>Agarosegel-Elektrophorese</i> .....	24
2.2.7 <i>Reinigung der DNA</i> .....	24
2.2.8 <i>Ligation und Transformation in den T-Vektor</i> .....	25
2.2.9 <i>Generierung der Positivkontrolle</i> .....	26
2.2.10 <i>Isolierung von Plasmid DNA</i> .....	26
2.2.11 <i>Restriktionsverdau</i> .....	28
2.2.12 <i>Sanger Sequenzierung</i> .....	29
2.2.13 <i>Primer Design</i> .....	30
2.2.14 <i>RT-qPCR</i> .....	30
2.2.15 <i>Validierung der RT-qPCR</i> .....	31
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>32</b>
3.1 <i>Generierung der Positivkontrolle</i> .....	32
3.2 <i>Validierung der RT-qPCR</i> .....	33
3.3 <i>RT-qPCR Ergebnisse</i> .....	37
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>45</b>
<b>5. Zusammenfassung .....</b>	<b>50</b>
<b>6. Summary.....</b>	<b>52</b>

<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>58</b>
<b>10. Danksagung .....</b>	<b>59</b>

### Abkürzungsverzeichnis

CITES.....	Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora
Ct.....	cycle threshold
Cq.....	Quantification cycle
et al.....	et alii (lat.) = und andere
GIT.....	Gastrointestinaltrakt
IBD.....	inclusion body disease
kb.....	Kilobasen
NEB.....	New England Biolabs
NGS.....	Next generation sequencing
nt.....	Nukleotide
ORF.....	Open Reading Frame
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR.....	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR.....	reverse Transkriptase quantitative PCR
sg mRNA.....	single guided messenger RNA
SNV.....	Schlangen-Nidovirus
U/min.....	Umdrehungen pro Minute
V.....	Volt

## 1. Einleitung und Fragestellung

### 1.1 Grüner Baumpython (*Morelia viridis*)

Die Rautenpythons (*Morelia*) bilden mit insgesamt fünf Arten eine Gattung aus der Familie der Pythons (*Pythonidae*). Die Mehrheit (62,7%) der Schlangen, die in dieser Studie untersucht wurden, sind Grüne Baumpythons (*Morelia viridis*). Es handelt sich dabei um eine ungiftige Schlangenart, die in der Terraristik weltweit verbreitet ist. *Morelia viridis* ist ein baumbewohnender Python, der aus tropischen Lebensräumen stammt und in einem großen Teil Neuguineas, einschließlich einiger Satelliteninseln und der Cape York-Halbinsel in Australien vorkommt (Barker und Barker 1994). Das außergewöhnliche und zugleich unterschiedliche Aussehen der verschiedenen Lokalformen hat zu einer großen Beliebtheit in der Terraristik geführt. Die Jungtiere von *Morelia viridis* sind entweder gelb oder rot gefärbt (Abbildung 1) und vollziehen beim Heranwachsen zu adulten Tieren eine ontogenetische Farbänderung zu einem leuchtendem Grün (Natusch und Lyons 2012). Die unterschiedlichen Farbmorphen mit ihren typischen Erscheinungsmerkmalen werden nach ihrem Herkunftsgebiet als Lokalformen betrachtet und dementsprechend bezeichnet (z.B. Aru, Biak, Sorong, Jayapura) (Maxwell 2005) (Abbildung 2). Entsprechend groß ist das Interesse an der Entdeckung neuer Morphen und Lokalitäten und eine beträchtliche Anzahl an Grünen Baumpythons wurde weltweit exportiert.



**Abbildung 1:** Grüner Baumpython (*Morelia viridis*) aus der Lokalform „Sorong“. Rot gefärbtes Jungtier. Foto: Jeff Schreiner, Dezember 2014



**Abbildung 2:** Grüner Baumpython (*Morelia viridis*) aus der Lokalform „Sorong“. Es handelt sich hierbei um das gleiche Individuum wie bei **Abb. 1**. Foto: Jeff Schreiner, Februar 2016

Grüne Baumpythons sind im Washingtoner Artenschutzübereinkommen im Anhang II gelistet CITES ([https://cites.org/eng/gallery/species/reptile/green\\_tree\\_python.html](https://cites.org/eng/gallery/species/reptile/green_tree_python.html)) (Zugriff 20.08.2020) sind keine CITES Papiere notwendig, um Tiere dieser Art legal zu besitzen oder mit ihnen zu handeln. Eine Identifikation durch Foto- oder Mikrochipdokumentation ist nicht notwendig. Lediglich ein Herkunftsnachweis wird vorausgesetzt.

Trotz der beachtlichen Ansprüche an die Haltung und der vergleichsweise hohen Krankheitsanfälligkeit, ist der Grüne Baumpython bei Schlangenzüchtern sehr beliebt (Gál 2009). In menschlicher Obhut zeigen Grüne Baumpythons nicht selten Atemwegserkrankungen und Anorexie, sowie vereinzelt auch Stomatitis-Symptome (Gál 2009, Blahak et al. 2020, Mustafa et al. 2020). Es wurde lange Zeit vermutet, dass diese Krankheitssymptome durch eine suboptimale Haltung in Kombination mit ungeeigneten, oftmals zu kalten klimatischen Bedingungen ausgelöst werden (Chitty 2004). Die Vermutung, dass diese klinischen Symptome im Zusammenhang mit SNV stehen, haben in der vorliegenden Studie dazu veranlasst, gezielt Bestände mit Schlangen aus der Gattung *Morelia* zu untersuchen.

## 1.2 RNA-Viren bei Reptilien

In den letzten Jahrzehnten haben neue diagnostische Verfahren zu einem fortgeschrittenen Wissen im Bereich der Virologie bei Reptilien geführt. Sequenzierungstechniken wie das „next generation sequencing“ (NGS) haben es ermöglicht, eine beträchtliche Anzahl neuer Viren bei Reptilien zu beschreiben (Ariel 2011). Diagnostische Hilfsmittel sind zunehmend kommerziell erhältlich geworden und das steigende Interesse an der Erforschung neuer Viren scheint in der letzten Zeit besonders groß zu sein. Folglich konnten virale Erreger als Ursache für Symptome verantwortlich gemacht werden, die bereits Jahrzehnte zuvor beschrieben wurden. Die Ätiologie von Krankheiten wie „Inclusion Body Disease“ (IBD), umgangssprachlich auch als Schlangen-AIDS bekannt oder Atemwegserkrankungen, vorwiegend bei Pythons, konnte dabei auf Virusinfektionen zurückgeführt werden (Stenglein et al. 2012, Bodewes et al. 2013, Hetzel et al. 2013).

Zu den klinisch bedeutendsten RNA-Viren bei Reptilien gehören Picornaviren bei Schildkröten und Paramyxoviren bei Schlangen. Während die Infektion mit Paramyxoviren oftmals mit Atemwegserkrankungen oder zentralnervösen Störungen einher geht, leiden mit Picornaviren infizierte Schildkröten unter Panzerweiche, Rhinitis, Stomatitis, Konjunktivitis und Aszites (Marschang 2011). Andere Viren, wie zum Beispiel Reoviren, haben in Übertragungsstudien keine oder eine unbeständige Krankheit hervorgerufen, so dass ihre Rolle als primäre Pathogene in Frage gestellt wurde (Gravendyck et al. 1998). Arenaviren konnten als ursächliche Erreger von IBD bei Schlangen verantwortlich gemacht werden (Bodewes et al. 2013).

Ein Großteil dieser Viren sind Bestandteil von Krankheitsprozessen, die durch die Viren selbst, sekundäre Infektionserreger, oder Umweltfaktoren beeinflusst werden (Ariel 2011). Zahlreiche RNA-Viren wie Paramyxo-, Reo-, und Arenaviren werden als ursächliche Erreger für Atemwegserkrankungen bei Reptilien und insbesondere bei Schlangen angesehen (Ariel 2011, Marschang 2011, Hyndman et al. 2012) (Tabelle 1).

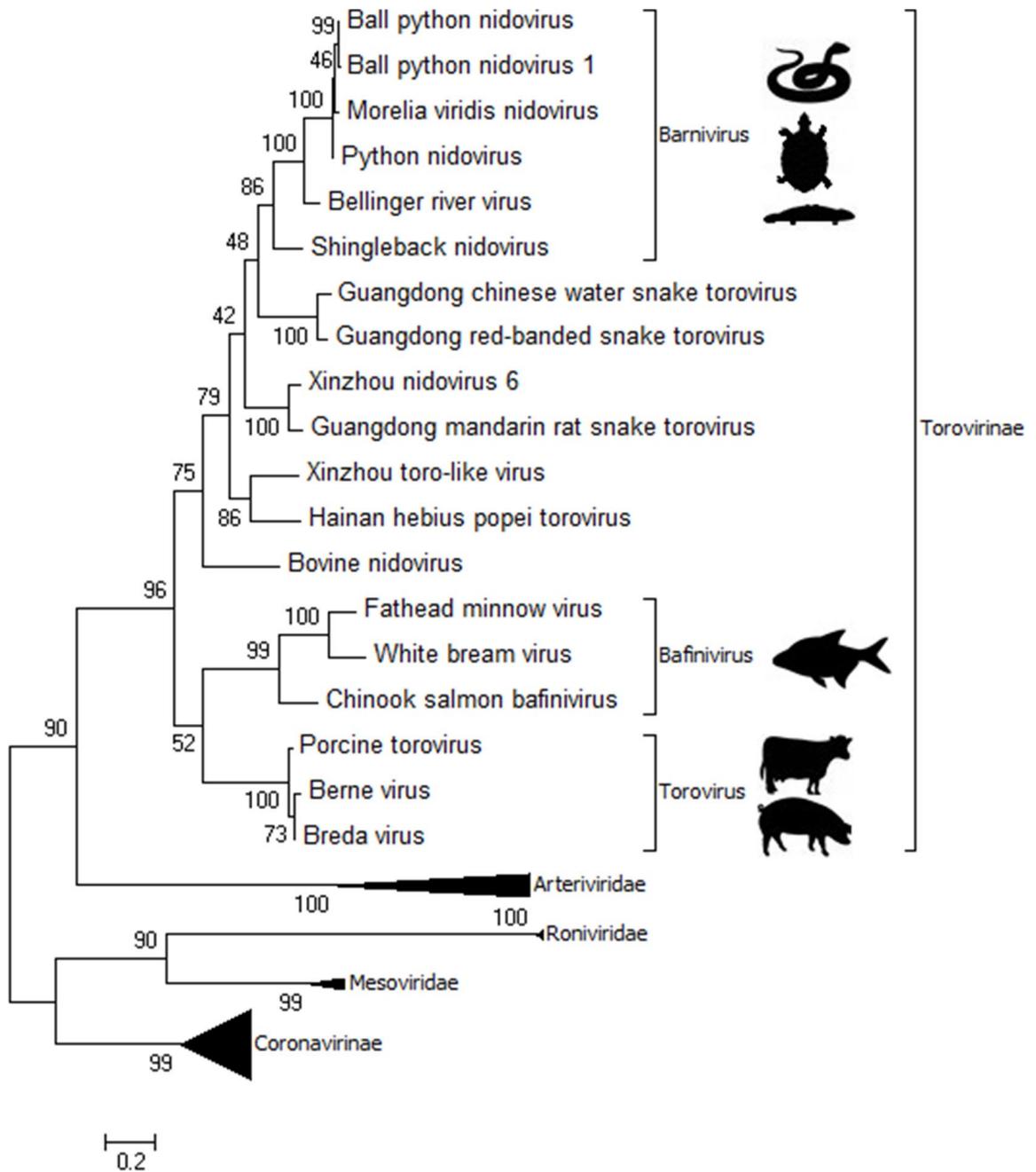
**Tabelle 1:** RNA-Viren bei Reptilien

Virusfamilie	Virusaufbau		Wirte
Retrovirus ( <i>Retroviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Echsen, Schlangen, Krokodile, Schildkröten
Bornavirus ( <i>Bornaviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Schlangen
Reovirus ( <i>Reoviridae</i> )	dsRNA	nicht behüllt	Echsen, Schlangen, Schildkröten
Rhabdovirus ( <i>Rhabdoviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Echsen, Schlangen
Paramyxovirus ( <i>Paramyxoviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Schlangen, Echsen Schildkröten
Arenavirus ( <i>Arenaviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Schlangen
Sunshinevirus ( <i>Sunviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Schlangen
Bunyavirus ( <i>Bunyaviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Meeresschildkröten, Echsen
Picornavirus ( <i>Picornaviridae</i> )	ssRNA	nicht behüllt	Meeresschildkröten, Schlangen
Calicivirus ( <i>Caliciviridae</i> )	ssRNA	nicht behüllt	Schlangen
Flavivirus ( <i>Flaviviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Meeresschildkröten, Schlangen, Krokodile
Togavirus ( <i>Togaviridae</i> )	ssRNA	behüllt	Meeresschildkröten, Schlangen, Echsen

### 1.3 Taxonomie der Nidoviren

Die Nidovirales bilden eine Ordnung in der virologischen Taxonomie, die verschiedene bekannte (z.B. Coronaviridae) und weniger bekannte Virusfamilien umfasst (Abbildung 3). Die Ordnung Nidovirales verfügt über eine komplexe Taxonomie auf der Basis molekularer Gemeinsamkeiten, die ständig erweitert und verändert wird. Aktuell sind acht Unterordnungen (Abnidovirinae, Arnidovirinae, Cornidovirinae, Mesnidovirinae, Monidovirinae, Nanidovirinae, Ronidovirinae und Tornidovirinae) definiert, die sich in 14 Familien und 25 Unterfamilien aufteilen. Die Nidoviren der Schlangen finden sich in der Unterordnung der Tornidovirinae, in der Familie Tobaniviridae, in der Unterfamilie Serpentovirinae, im Genus Pregotovirus, Subgenus Roypretovirus: *Ball python nidovirus 1* bzw. *Morelia tobanivirus 1* (ICTV, 2019).

Zur Ordnung der Nidoviren gehören, unter anderem, auch Coronaviren, die ebenfalls respiratorische Symptome verursachen. Epidemien wie beim ‚severe acute respiratory syndrome (SARS)‘ oder ‚Middle East respiratory syndrome (MERS)‘ haben gezeigt, dass Viren aus der Familie der Coronaviren von Wildtieren auf Menschen übertragen werden können. Innerhalb der letzten 18 Jahre, kam es zu drei bedeutenden zoonotischen Infektionen mit Coronaviren: SARS-CoV-1 im Jahr 2002, MERS-CoV im Jahr 2012 und seit Dezember 2019 SARS-CoV-2.



**Abbildung 3:** Phylogenetischer Baum, der die genetischen Beziehungen der Mitglieder der Unterfamilie Torovirinae auf der Grundlage der konservierten RdRp-Stelle des Polyproteins 1b zeigt. (Zhang et al. 2018)

#### 1.4 Nidoviren bei Reptilien

Im Jahr 2014 wurde ein neues Virus, das sogenannte Schlangen-Nidovirus (SNV) in Königspythons (*Python regius*) und in einem Hellen Tigerpython (*Python molurus*) mit Hilfe von NGS entdeckt (Bodewes et al. 2014, Stenglein et al. 2014, Uccellini et al. 2014). Im ersten Bericht aus den USA wurde die Untersuchung von acht Königspythons beschrieben, die an einer Pneumonie verstorben sind. Mithilfe von Sequenzanalysen konnte dabei ein neuartiges Nidovirus identifiziert werden (Stenglein et al. 2014). Eine zweite Arbeitsgruppe aus den USA untersuchte zwölf Königspythons mit Pneumonien, Ösophagitis und Tracheitis und konnte Nidoviren mittels In-Situ-Hybridisierung (ISH) und PCR nachweisen (Uccellini et al. 2014). Eine dritte Arbeitsgruppe beschrieb die Ergebnisse einer diagnostischen Aufarbeitung eines Hellen Tigerpythons, bei dem eine schwere, nekrotisierende Lungenentzündung diagnostiziert wurde (Bodewes et al. 2014). Es konnten starke Ähnlichkeiten der Genomorganisation und den Replikase-Enzymen zwischen der SNV und anderer Viren der Ordnung Nidovirales festgestellt werden.

Drei Jahre später wurden Nidoviren erstmals bei Grünen Baumpythons (*Morelia viridis*) beschrieben (Dervas et al. 2017). Zwölf Tiere mit Lungenentzündung wurden untersucht und positiv auf Nidoviren getestet. Die Sequenzierung ergab weniger als 85% Übereinstimmung mit den zuvor veröffentlichten Sequenzen der Nidoviren, die bei *Python regius* und *Python molurus* beschrieben wurden.

Schlangen-Nidoviren finden sich sämtlich in der Unterordnung Tornidovirineae. Laut der neuesten Klassifikation aus dem Jahr 2019 des ‚International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)‘ findet sich das Schlangen-Nidovirus in der Familie der Tobaniviridae wieder. Innerhalb dieser Familie umfasst die Unterfamilie Serpentovirinae unter anderem das Subgenus Roypretovirus mit der Virusspezies *Ball-Python-Virus 1* (ICTV, 2019) (Ferron et al. 2019, Hoon-Hanks et al. 2020).

Blahak et al. (2020) untersuchten mit einer neu entwickelten RT-qPCR, die das ORF1B detektiert, unterschiedliche Gewebe von neun verstorbenen Grünen Baumpythons. Dabei konnten unterschiedliche SNV in Lunge, Leber, GIT, Nieren und Gehirn nachgewiesen werden.

Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der histologischen Veränderungen und dem quantitativen Nachweis viraler RNA konnte nachgewiesen werden. Die höchsten Viruslasten wurden in der Lunge festgestellt, während die anderen getesteten Organe abweichende Mengen an viraler RNA ergaben. Die Atemwege bilden den primären Ort der Virusreplikation und machen die Übertragung durch Atemwegssekrete wahrscheinlich (Blahak et al. 2020). Ob das Nidovirus über das Gelege auf die Nachkommen übertragen werden kann, ist zum derzeitigen Wissensstand nicht bekannt. Weitere wissenschaftliche Untersuchungen zu den möglichen Übertragungswegen wären sicherlich von großem Interesse sowohl für die Wissenschaft, als auch für die Gesundheit der Tiere.

## **1.5 Klinische Ausprägung der Nidovirusinfektionen**

### Nidoviren bei Schlangen

Nidoviren spielen eine wichtige Rolle als pathogene Erreger im Zusammenhang mit respiratorischen Symptomatiken bei Schlangen. Infektionen mit dem SNV wurden mit Pharyngitis, Sinusitis, Stomatitis, Tracheitis, Anorexie, sowie ulzerierenden Pneumonien bis hin zu einer Proliferation der gesamten Lunge assoziiert (Stenglein et al. 2014). Die Infektionen waren von schweren bakteriellen Sekundärinfektionen, beispielweise mit Salmonellen oder Bordetellen, begleitet (Bodewes et al. 2014). Studien beschreiben eine wachsende Zahl an SNV-Stämmen in unterschiedlichen Schlangenarten, darunter Königspythons (*Python regius*) (Stenglein et al. 2014, Uccellini et al. 2014), Dunkle Tigerpythons (*Python molurus bivittatus*) (Marschang und Kolesnik 2017), Helle Tigerpythons (*Python molurus*) (Bodewes et al. 2014, Marschang und Kolesnik 2017), Teppichpythons (*Morelia spilota*) (Marschang und Kolesnik 2017), Abgottschlangen (*Boa constrictor*) (Marschang und Kolesnik 2017) und Grüne Baumpythons (*Morelia viridis*) (Dervas et al. 2017, Abbildung 4). Der Zusammenhang zwischen SNV als ursächliche Erreger für Atemwegserkrankungen wurde durch den Nachweis von viralem Antigen und viraler RNA im betroffenen Epithel des Lungengewebes in Königspythons verantwortlich gemacht (Hoon-Hanks et al. 2018). Dazu wurden experimentelle Infektionen von *Python regius* mit einem zellkulturisolierten Virusstamm (BPNV-148) durchgeführt. Die Koch'schen Postulate wurden dementsprechend erfüllt und SNV konnte als Ursprung dieser respiratorischen Erkrankungen bei *Python regius* belegt werden (Hoon-Hanks

et al. 2018). Das genaue Wirtsspektrum von SNV und die Sequenzvielfalt der SNV sind derzeit noch unbekannt. Es wurde lediglich eine begrenzte Anzahl diagnostischer Methoden zur Detektion von SNV vorgestellt; Mittels RT-qPCR, Immunhistochemie, Western Blot und Virusisolierung konnte Nidovirus in Maul-, Kloakentupfer und in postmortal entnommenen Gewebeproben infizierter Schlangen nachgewiesen werden (Hoon-Hanks et al. 2018).



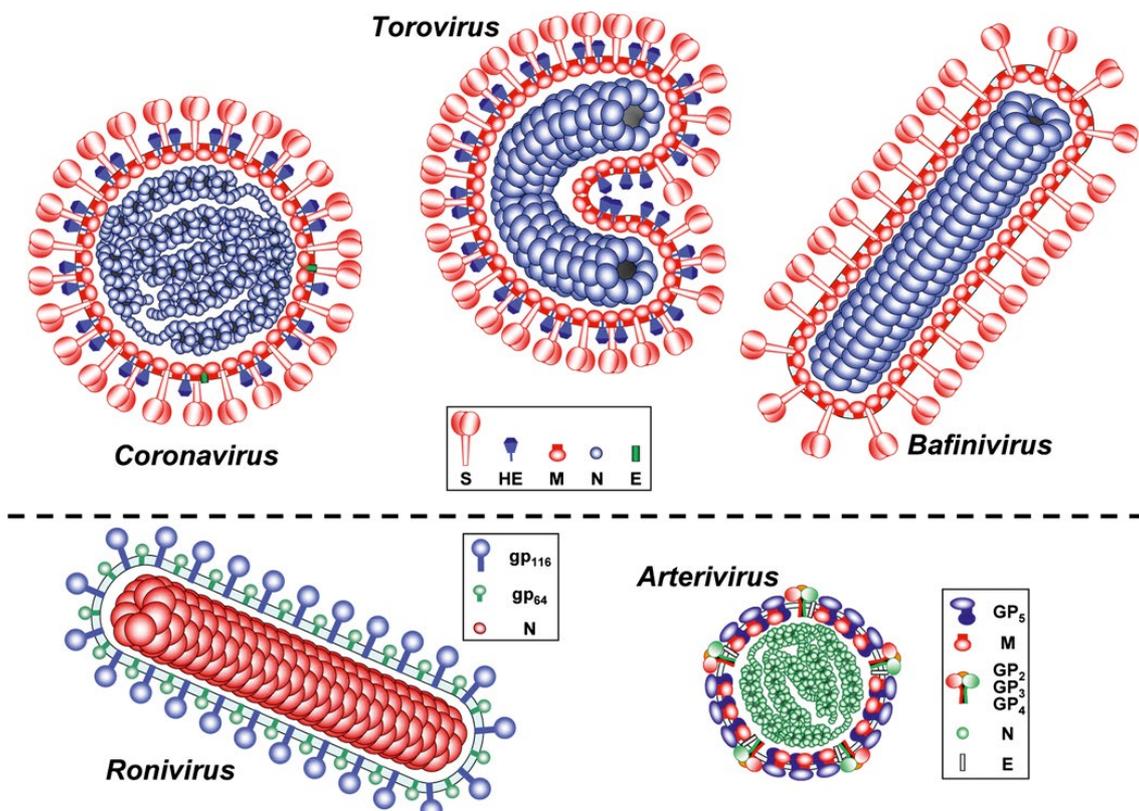
**Abbildung 4:** Juveniler Grüner Baumpython (*Morelia viridis*) aus der Lokalform „Sorong“ mit einer hochgradigen rezidivierenden Stomatitis. Dieses Tier wurde im Rahmen dieser Arbeit positiv auf Nidovirus getestet. Foto: Jeff Schreiner, Oktober 2018

#### Nidoviren bei anderen Reptilien

Interessanterweise konnten 2015 bei Tannenzapfenechsen (*Tiliqua rugosa*) in freier Wildbahn verwandte Nidoviren nachgewiesen werden (O’Dea et al. 2016). Die Tiere zeigten klinische Symptome, wie übermäßige Schleimsekretion und Anorexie. Im Jahr 2018 konnten Nidoviren bei der australischen Schildkrötenart *Myuchelys georgesi* und bei schlangenassoziierten Nematodenarten nachgewiesen werden (Zhang et al. 2018). Ende 2020 wurde Nidovirus weltweit zum zweiten Mal bei Echsen, in einem Bestand juveniler Jemenchamäleons (*Chamaeleo calyptratus*) mit respiratorischer Erkrankung, beschrieben (Hoon-Hanks et al. 2020).

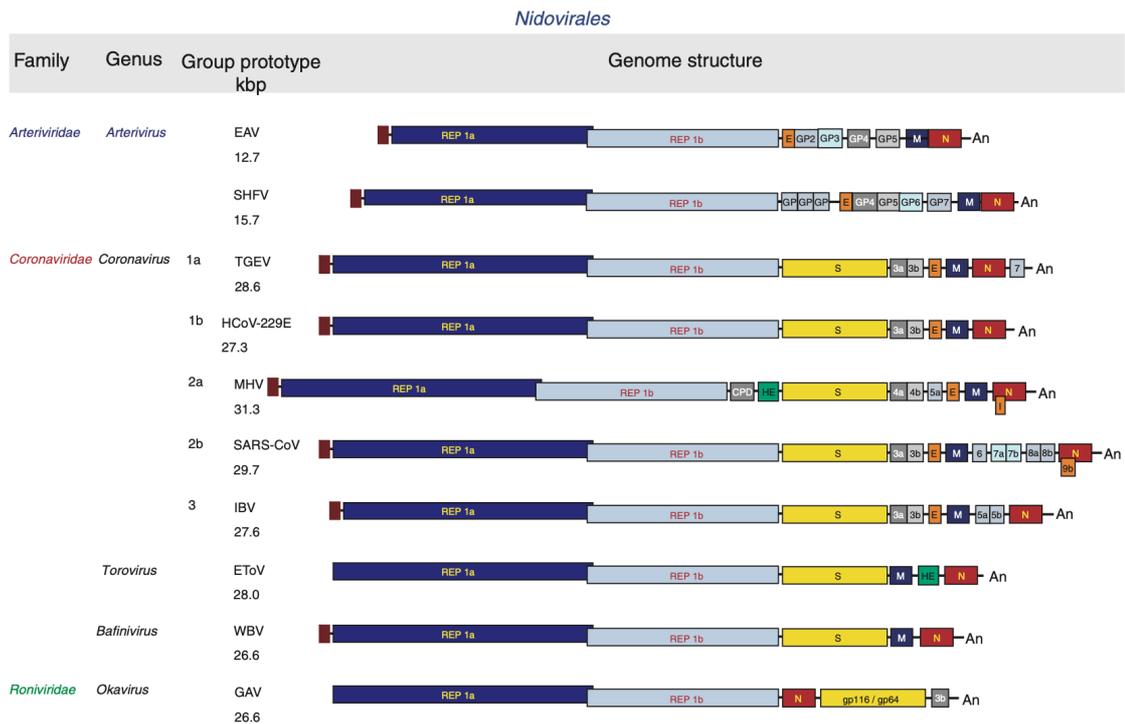
## 1.6 Genomaufbau und Transkriptionsstrategie

Nidoviren sind behüllte Viren mit einem großen, nicht segmentierten positiv-strängigen RNA-Genom und gehören zur Subfamilie Torovirinae. Sie besitzen die längsten, bisher beschriebenen RNA Virusgenome mit einer Größe von bis zu 32,4 kb. Die innere Nukleokapsidstruktur wird von einer Lipidhülle geschützt, die von einer Vielzahl von Oberflächenproteinen besetzt ist. Diese Glykoproteine werden auch als Peplomere oder Spikes bezeichnet und sind für das außergewöhnliche, morphologische Erscheinungsbild dieser Viren verantwortlich (Abbildung 4). Das Nukleokapsid wird von einem einzigen N-Protein gebildet, das mit der genomischen RNA interagiert (Britton und Cavanagh 2014). Die Form der Viruspartikel kann je nach Virusfamilie rund, stäbchen- oder nierenförmig sein (Abbildung 4). Der Durchmesser variiert dabei von 40 bis 200 nm (Gorbalenya et al. 2006).



**Abbildung 5:** Vereinfachte schematische Darstellung der unterschiedlichen Morphologie verschiedener Vertreter aus der Ordnung der Nidovirales. (ICTV Ninth Report; 2009 Taxonomy Release de Groot et al.)

Die genomische RNA von Nidoviren besitzt am 5'-Ende eine CAP-Struktur und ist am 3'-Ende polyadenyliert. Sie ist typischerweise in offene Leseraster (ORFs) organisiert, die mehr als 90% des Genoms ausmachen und in drei Regionen unterteilt werden können: Überlappende ORF1a und ORF1b sowie mehrere ORFs am 3'-Ende. Die Produkte dieser Regionen kontrollieren vorwiegend die Expression und Replikation des Genoms (Nga et al. 2011) (Abbildung 5).



**Abbildung 6:** Genomorganisation einzelner Nidoviren mit Bezeichnung der einzelnen Genomabschnitte (Enjuanes et al. 2008).

Rund zwei Drittel des Genoms am 5'-Ende wird von zwei teilweise überlappenden offenen Leseraster (ORF1a und ORF1b) eingenommen. Sie kodieren für das Replikase-Polyprotein, während die proximalen 3'-Genomregionen die strukturellen und in einigen Fällen akzessorische, virusspezifische Proteine kodieren. Die Expression des Nidovirus-Genoms wird auf verschiedenen Ebenen, der transkriptionellen, der translationalen am Ribosom sowie der posttranslationalen Ebene kontrolliert. Für die Expression von ORF1b ist ein ribosomaler Frameshift erforderlich, um die beiden Replikase-Proteine (pp1a und pp1ab) durch virale Proteasen zu prozessieren. Die proteolytische Prozessierung erfolgt in koordinierter Weise und

führt zur Bildung der funktionellen Untereinheiten des viralen Replikations-/Transkriptionskomplexes. Die Expression der strukturellen und akzessorischen Proteine wird auf Ebene der Transkription kontrolliert. (Britton und Cavanagh 2014)

Die RNA-abhängige RNA-Transkription beinhaltet bei den meisten Nidoviren einen nicht fortlaufenden RNA-Syntheseschritt (diskontinuierliche Transkription, DT). Dieser Prozess findet während der Produktion von subgenomischen mRNAs (sg mRNAs) statt, die als Vorlagen für die Transkription dienen. Diese sg mRNAs besitzen alle das gleiche 3'-Ende, wohingegen das 5'-Ende abhängig von der Virusfamilie, oder der Virusgattung variieren kann. Das Genom und die sg mRNAs teilen sich eine 5'-„leader“-Sequenz von 55-92 nt bei Coronaviren und 170-210 nt bei Arteriviren.

Sogenannte Transkriptions-regulatorische Sequenzen (TRSs) spielen eine wichtige Rolle bei der Produktion der subgenomischen RNAs (Gorbalenya et al. 2006, Pasternak et al. 2006). Diese konservierten Sequenzelemente befinden sich bei Corona- und Arteriviren am genomischen 5'-Ende („leader“-TRS) und vor den meisten 3'-terminalen ORFs („body“-TRS).

Toroviren (Subfamilie Torovirinae) wenden zur Herstellung ihrer mRNAs eine gemischte Transkriptionsstrategie an. Nur die erste der vier gebildeten sg mRNAs weist eine 5'-gelegene „leader“-TRS auf. Die restlichen drei sg mRNAs haben keine 5' gelegene „leader“-Sequenz und werden durch nicht diskontinuierliche (NDT) RNA-Synthese hergestellt. (Enjuanes et al. 2008)

Okaviren (Familie *Roniviridae*) besitzen keine 5'-terminale „leader“-TRS. Die sg mRNAs entstehen durch einen kontinuierlichen (nicht diskontinuierliche Transkription, NDT) Mechanismus bei dem ein ca. 20 nt langes Sequenzmotiv die Rolle eines Initiators der Transkription übernimmt. (Cowley et al., 2002; Gorbalenya et al., 2006; Sittidilokratna et al., 2008).

Zusätzlich zu den regulatorischen RNA-Sequenzen spielen wahrscheinlich virale und Wirtskomponenten, die an der Protein-RNA- und Protein-Protein-Erkennung beteiligt sind, eine Rolle für die Transkription. Trotz der vermuteten gemeinsamen Abstammung von Nidoviren, scheinen Ronivirus- und Torovirus-mRNAs keine gemeinsame 5'-Leader-Sequenz

zu besitzen. Offenbar gibt es innerhalb der Familie der Nidoviren große mechanistische Unterschiede. (Pasternak et al. 2006)

### **1.7 Ziel der Studie**

Aufgrund der klinischen Relevanz von Nidoviren bei Reptilien und insbesondere bei Schlangen, besteht das Ziel dieser Studie darin, ein molekulardiagnostisches Verfahren für den Nachweis von Nidoviren bei lebenden Schlangen zu entwickeln. Eine neue diagnostische reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) soll in Zukunft am Institut der Virologie an der Vetmeduni Vienna eingesetzt werden, um den Nachweis von SNV im Rahmen der diagnostischen Dienstleistungen anbieten zu können. Während die erst kürzlich veröffentlichten Primer der RT-qPCR von Blahak et al. (2020) auf das offene Leseraster 1B (ORF1B) ausgerichtet sind, ist die Zielsequenz der in dieser Studie neu designten Primer der ORF5, der für ein hochkonserviertes Nukleoprotein (N-Protein) des SNV kodiert. Die Primer für das in dieser Arbeit entwickelte RT-qPCR Assay wurden so ausgewählt, dass sie an sehr gut konservierte Gensequenzen des Nukleoproteins (N-Protein) binden und dadurch einen zuverlässigen Nachweis von SNV ermöglichen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sensitivität des Assays bestimmt und unterschiedliche Probenmaterialien von Schlangenzuchten aus Österreich und Luxemburg auf das Vorhandensein des Erregers untersucht. Der Fokus dieser Untersuchungen wurde dabei auf Schlangen der Gattung *Morelia* gelegt, da für diese Gattung ein Zuchtbetrieb zur Verfügung stand, der regelmäßige Probenentnahmen und genaue Beobachtungen der Symptome ermöglichte.

Die PCR-Untersuchungen sollen einen Hinweis auf die Prävalenz von SNV in Tierbeständen mit Schlangen aus der Gattung *Morelia* in menschlicher Obhut geben. Dabei soll ein Augenmerk auf den Zusammenhang zwischen der typischen klinischen Symptomatik und einem positiven PCR-Nachweis von SNV gelegt werden. Außerdem werden unterschiedliche Probenmaterialien auf die Eignung für den Nachweis einer Infektion mit SNV untersucht.

Zusätzlich sollen die wiederholten Untersuchungen eines einzelnen Bestandes (Zucht A) über einen Zeitraum von mehreren Monaten, erste Hinweise auf die Konstanz der Virusausscheidung innerhalb einer einzelnen Population geben.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Auswahl der Tiere**

Voneinander unabhängige Zuchten in Österreich und in Luxemburg wurden im Laufe der Etablierung dieser RT-qPCR auf das Vorkommen des neuen SNV untersucht. In die Studie wurden sowohl klinisch unauffällige Tiere, als auch Schlangen mit typischen Atemwegsbeschwerden wie rasselnden Atemgeräuschen, oder serösem bzw. mukösem Maulausfluss einbezogen. Weitere Informationen wie Harn/Harnsäure- und Kotabsatz, Häutungs- und Fressverhalten wurden erfasst. Zudem wurde gezielt darauf geachtet, ob an den Glasscheiben der Terrarien Spuren von vertrockneten Schleimsekreten zu erkennen war, die einen Hinweis auf eine vermehrte Mukusproduktion geben. Verhaltensänderung oder klinische Auffälligkeiten wie Dehydratation wurden erfragt. Anschließend wurden die Tiere bei der Beprobung klinisch untersucht.

Die Tiere stammten aus 12 verschiedenen Beständen in Österreich, sowie einer Zucht in Luxemburg (kodiert als Zucht A bis M), darunter Bestände aus 4 verschiedenen zoologischen Gärten in Österreich. 85,5 % der untersuchten Schlangen gehörten zur Familie der Pythonidae (n = 71) und die restlichen 14,5 % gehörten zur Familie der Boidae (n = 12). Schlangen aus anderen Familien wurden in dieser Studie nicht untersucht.

Die Schlangen aus acht der insgesamt dreizehn Bestände zeigten keine klinischen Symptome. Alle Tiere aus diesen Beständen erschienen gesund und während der Probengewinnung gab es keine entsprechende Anamnese oder Hinweise auf Erkrankungen oder Verminderung des Allgemeinverhaltens. Im Gegensatz dazu wurden leichte bis schwere klinische Symptome bei einzelnen Tieren aus den übrigen fünf Beständen gemeldet (Tabelle 5). Zu diesen Symptomen zählten Pharyngitis, Tracheitis, erhöhte Schleimproduktion im Maul, Stomatitis und Dyspnoe (Abbildung 7). Zwei Tiere aus dem Bestand J (65J und 66J) wurden durch ein kommerzielles Labor (LABOKLIN GmbH & Co) über Maultupfer positiv auf Nidovirus getestet. Zwei der

beprobten Tiere starben während der Studienzeit an schweren Atemwegserkrankungen in Kombination mit Anorexie.

### 2.1.2 Allgemeine Probenauswahl

Für diese Studie wurden insgesamt 128 diagnostische Proben von 83 Schlangen 11 unterschiedlicher Arten zwischen 2018 und 2019 entnommen (Tabelle 2). Darunter 98 Maultupfer, 4 Kloakaltupfer, 13 Kotproben, 8 Plasmaproben und 5 Serumproben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden gezielt Halter kontaktiert, die sich mit der Zucht von Schlangen aus der Gattung *Morelia* beschäftigen. Obwohl die Probenentnahme inklusiver Untersuchung und RT-qPCR nicht in Rechnung gestellt wurde, hat der Großteil der Züchter abgelehnt. Die Begründung der Absage ging mit der Befürchtung eines positiven Ergebnisses einher. Ein positiver Befund auf das Schlangen-Nidovirus im Bestand würde ihnen den Verkauf der Nachzuchten erschweren und dadurch finanzielle Einbußen mit sich bringen. Eine räumliche Trennung und Isolierung infizierter Tiere vom restlichen Bestand stellt darüber hinaus eine erhebliche Erschwernis dar.

**Tabelle 2:** Die 13 unterschiedlichen Bestände wurden mit den Buchstaben A-M kodiert. Eine jeweilige Tier-ID kennzeichnet jedes einzelne Tier mit einer individuellen Nummer und dem Buchstaben des Bestandes. Insgesamt wurden 83 Schlangen getestet.

Bestands-ID	Anzahl	Art	Tier-ID
<b>A</b>	8	<i>Morelia viridis</i>	1A – 8A
<b>B</b>	3	<i>Boa constrictor</i>	9B – 11B
	3	<i>Acrantophis dumerili</i>	12B – 14B
	3	<i>Morelia viridis</i>	15B – 17B
	3	<i>Morelia spilota</i>	18B – 20B
	1	<i>A. madagascariensis</i>	21B
	2	<i>Epicrates cenchria</i>	22B – 23B
	2	<i>Liasis mackloti</i>	24B – 25B
	1	<i>S. madagascariensis</i>	26B
<b>C</b>	6	<i>Morelia viridis</i>	27C – 32C
<b>D</b>	2	<i>Morelia viridis</i>	33D – 34D

<b>E</b>	4	<i>Morelia carinata</i>	35E – 38E
<b>F</b>	4	<i>Morelia viridis</i>	39F – 42F
<b>G</b>	2	<i>Python regius</i>	43G – 44G
<b>H</b>	9	<i>Morelia viridis</i>	45H – 53H
<b>I</b>	11	<i>Morelia viridis</i>	54I – 64I
<b>J</b>	9	<i>Morelia viridis</i>	65J – 73J
<b>K</b>	2	<i>Acrantophis dumerili</i>	74JK – 75K
<b>L</b>	4	<i>Morelia spilota</i>	76L – 79L
	2	<i>Python reticulatus</i>	80L – 81L
<b>M</b>	2	<i>Python regius</i>	82M – 83M

### 2.1.3 Vorgegangene Untersuchungen der Zucht A

Der Zuchtbestand A bestand aus 20 erwachsenen Grünen Baumpythons (*Morelia viridis*), darunter 14 Weibchen und 6 Männchen. Die Tiere stammen ursprünglich von 11 privaten Züchtern und einer indonesischen Zuchtfarm. 6 Schlangen aus diesem Bestand stammen aus der eigenen Zucht und sind Jungtiere durch Verpaarungen der oben genannten Individuen.

Ein Königspython (*Python regius*) der in der Zucht A untergebracht wurde, zeigte eine Episode mit erschwelter Atmung und verstärktem Schleimausfluss aus dem Maul. Nachdem ein oraler Abstrich mittels PCR durch ein kommerzielles Labor (LABOKLIN GmbH & Co) ein positives Ergebnis auf Nidovirus ergab, wurde das Tier durch den Besitzer aus dem Bestand entnommen. Zusätzliche kommerzielle Labor-PCR-Tests der Zucht A auf Arena-, Adeno-, Reo- und Paramyxovirus ergaben negative Ergebnisse. Anschließend wurden bei allen Grünen Baumpythons dieses Bestandes orale Tupfer entnommen, die mit Hilfe von PCR-Tests auf Nidovirus durch dasselbe kommerzielle Labor untersucht wurden. 8 Tiere (2 Männchen, 6 Weibchen) wurden dabei positiv getestet, während die Maulabstriche 12 weiterer Tiere negative Ergebnisse erbrachten. Die positiv getesteten Proben wurden in dieser Studie, unter anderem, zur Validierung der entwickelten RT-qPCR verwendet.

Die 8/20 (40%) positiv getesteten Tiere der Zucht A, die in dieser Studie weiter untersucht wurden, stammten ursprünglich von 6 verschiedenen Züchtern. Beim Erwerb dieser Schlangen konnten durch den Züchter keine klinischen Symptome festgestellt werden. Die 8 positiv getesteten Tiere wurden anschließend durch den Halter über einen Zeitraum von 21 Monaten genau auf klinische Symptome untersucht.

#### **2.1.4 Gewinnung des Untersuchungsmaterials der Zucht A**

Der Bestand A (Tiere 1A-8A) wurde im April 2018, im Februar 2019 und im Juni 2019 auf SNV untersucht. Im April 2018 wurden ausschließlich Maultupfer analysiert. Im Februar 2019 wurden zusätzlich Kloakaltupfer, Kot, Serum und Plasma untersucht. Insgesamt konnten im Februar 6 Kotproben und 4 Kloakaltupfer analysiert werden. Die 8 Plasma- und 5 Serumproben wurden von einem Tierarzt zum Ausschluss einer Koinfektion mit IBD entnommen und mit eindrücklicher Zustimmung des Tierbesitzers für SNV-Tests weiterverwendet. Im Juni konnte mit Ausnahme eines einzelnen Tieres (6A), der Kot aller Tiere aus dem Bestand A zusätzlich zu den Maultupfern untersucht werden. Insgesamt wurden bei der Zucht A über einen Zeitraum von 14 Monaten 23 Maultupfer, 13 Kotproben, 4 Kloakaltupfer, 8 Plasma- und 5 Serumproben untersucht.

Die Pythons wurden entweder einzeln oder paarweise (während der Zuchtsaison) in selbstgebauten Kunststoffterrarien mit Glasschiebetüren untergebracht. Die künstliche Beleuchtung erfolgt durch Leuchtstoffröhren, und eine zusätzliche Wärmequelle wird durch ein elektrisches „Heatpanel“ gewährleistet. Die Terrarien sind in mehreren getrennten Räumen untergebracht. Die Schlangen werden mit frisch aufgetauten Mäusen und Ratten gefüttert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Primer

**Tabelle 3:** Verwendete Primer und Sonde die das N-Protein kodieren.

Primer Name	Zielsequenz	Sequenz (5'-3')	Richtung (F/R)
NVNforw28644		ATGGCAACATATTATCCCATTTC	F
NVNrev29079		TTACACTTCTTCTTCGGTTTCAGC	R
SNVqforw28857	N-Protein	CAAGAASMGCCAGAGAGTTGC	F
SNVqrev28937	N-Protein	TTGACRTRGTGGGTRAGT	R
SNVprobe28879	N-Protein	Fam-TGCARCCRACTCTYGASTCTGACGT-TamRa	F

Die Oligonukleotide SNVqforw28857, SNVqrev28937 und SNVprobe28879 wurden vom Referenzgenom *Morelia viridis* nidovirus strain S14-1323\_MVNV (Genbank MF351889.1) abgeleitet (Tabelle 3). Das hochkonservierte Gen des Nukleoproteins (N-Protein) dient dabei als Zielsequenz für den Nachweis einer Infektion mit Nidovirus. Die Primer wurden zur Herstellung bei Eurofins (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) in Auftrag gegeben.

### 2.2.2 Verwendete Kits und Reagenzien

Monarch DNA Gel Extraction Kit<sup>®</sup> (NEB, Ipswich, USA)

QIAquick PCR Purification Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland)

RNeasy Mini RNA Isolation Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland)

FavorPrep Gel/PCR Purification Kit<sup>®</sup> (Favorgen Biotech Corp. Taiwan)

Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit<sup>®</sup> (NEB, Ipswich, USA)

QIAGEN One-Step RT-PCR Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland)

OneTaq One-Step RT-PCR Kit<sup>®</sup> (NEB, Ipswich, USA)

One-Step RT-PCR Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland)

Plasmid-Präparations-Minikit<sup>®</sup> (Favorgen Biotech Corp., Ping-Tung, Taiwan)

pGEM T-easy Vektor<sup>®</sup> (Promega, Fitchburg, USA)

### **2.2.3 Probennahme und Transport**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Maultupfer, Kloakaltupfer, Kot, sowie einzelne Serum- und Plasmaproben untersucht. Alle Proben wurden von einem Tierarzt oder dem Verfasser der vorliegenden Arbeit entnommen, um die Qualität der Tupferproben und eine eindeutige Identifizierung der jeweiligen Einzeltiere zu gewährleisten. Für die Probenentnahmen wurden jeweils 15 cm lange, trockene und sterile Wattestäbchen (unterschiedliche Hersteller) verwendet um Proben aus der Maulhöhle, auf Höhe der Glottis, zu entnehmen. Während der Beprobung wurden die Schlangen händisch hinter dem Kopf fixiert. Weitere Eingriffe wie Sedierung, oder Anästhesie waren nicht notwendig. Einzelne Plasma- und Serumproben, die von einem Tierarzt zum Ausschluss einer Koinfektion mit IBD entnommen wurden, sind mit eindrücklicher Zustimmung des Tierbesitzers für SNV-Tests weiterverwendet worden. Zudem wurden einzelne Kotproben der untersuchten Tiere an das Institut für Virologie eingeschickt. Die Proben wurden gekühlt durch einen medizinischen Spezialtransport verschickt und anschließend bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert (Forman und Valsamakis 2011).

Die Halter der beprobten Tiere haben alle den Untersuchungen ausdrücklich zugestimmt. Die Namen der Tierbesitzer, die geographischen Standorte der Zuchtanlagen und die Identifikationsmerkmale der beprobten Tiere wurden vom Untersucher erfasst und liegen als solche vor. Aus datenschutzrechtlichen Gründen werden diese Informationen in dieser Studie nicht erwähnt. Aufgrund der diagnostischen Zielsetzung der Probenahme bzw. der nicht-invasiven Probenentnahme war keine besondere Genehmigung nach den §§ 26ff. des österreichischen Tierversuchsgesetzes von 2012 erforderlich.

### **2.2.4 RNA Extraktion**

Die RNA Extraktion wurde mit dem RNeasy Mini RNA isolation Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden die Maultupfer und Kloakenabstriche in 500 µl RNase-freiem Wasser ausgewaschen. Das RNase-freie Wasser wurde mit dem Milli-Q (Q-pods‘ Millipore System, Bedford, USA) hergestellt. Die RNA wurde aus den Suspensionen und den Plasma- und Serumproben mit dem QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden,

Deutschland) nach den Anweisungen des Herstellers extrahiert. Dazu wurden 100 µl der Suspension in einer Qiashreder Spinsäule zentrifugiert (13000 U/min, 2 min). Die Säule des Röhrchens wurde verworfen und es wurden 350 µl 70%iges EtOH hinzupipettiert und durchmischt. 700 µl der Suspension wurden in eine RNeasy Spinsäule überführt, zentrifugiert (1300 U/min, 1 min) und der Durchfluss verworfen. Auf die Säule des Röhrchens wurden 700 µl Wasch-Puffer (RW1) pipettiert, zentrifugiert (13000 U/min, 1 min) und anschließend zweimal mit dem Wasch-Puffer (RPE) gewaschen und zentrifugiert. Jeder Waschgang wurde 1 min lang bei 13000 U/min zentrifugiert und anschließend wurde die Säule weitere 1 min lang bei 13000 U/min „trocken“ zentrifugiert. Die Säule wurde im Anschluss auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die virale RNA in 60 µl RNase-freiem destilliertem Wasser (H<sub>2</sub>Odd), nach einer Inkubationszeit von 1 min bei Raumtemperatur, eluiert und direkt für die RT-qPCR verwendet oder für anschließende Analysen bei -80 °C gelagert.

### 2.2.5 RT-PCR

Die RT-PCR zur Generierung der Positivkontrolle wurde mit dem One-Step RT-PCR Kit<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) zusammen mit den Oligonukleotiden NVNforw28644 und NVNrev29079 durchgeführt. Letztere wurden mit der AbiPrism Primer Express<sup>®</sup> 2.0.0 Software (Applied Biosystems, Foster City, USA) entworfen. Die RT-PCR wurde mit dem FastGene Ultra Cycler Gradient<sup>®</sup> (Nippon Genetics, Europe) durchgeführt. Jede PCR-Reaktion bestand aus einem 25 µl Ansatz, der sich aus 23 µl Mastermix und 2 µl RNA Extrakt wie folgt zusammensetzt.

QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer, 5x	5 µl
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	1 µl
dNTP mix (10mM each)	1 µl
Forward Primer 10 µM NVNforw28644	1 µl
Reverse Primer 10 µM NVNrev29079	1 µl
Template RNA	2 µl
Nuklease freies Wasser	14 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

Als Template dienten dabei Proben, die bereits in einem kommerziellen Labor (LABOKLIN GmbH) positiv auf Nidoviren untersucht wurden.

Die RT-PCR wurde bei folgenden Temperaturen durchgeführt: Reverse Transkription für 30 min bei 50°C, initiale Denaturierung bei 95°C für 15 min, Denaturierung 1 min bei 94°C, Annealing für 30 sec bei 65°C, Extension für 1 min bei 72°C für 40 Zyklen; finale Extension für 10 min bei 72°C.

### **2.2.6 Agarosegel-Elektrophorese**

Die PCR-Amplicons wurden einer Gelelektrophorese (Mupid-One, Advance, Japan) bei 100V für 30 min unterzogen und mit einem Gelextraktionskit (NEB) aufgereinigt. Zur elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte wurde eine 0,8%igen Agarosekonzentration und ein DNA-Farbstoff „Peq Green“ (Peqlab, Erlangen, Deutschland) verwendet. Unter einer Spannung von 100 V sind die negativ geladenen Nukleinsäuren während 30 min Richtung positiv geladene Anode migriert. Dazu wurde die Elektrophoresekammer Mupid-One ADVANCE verwendet.

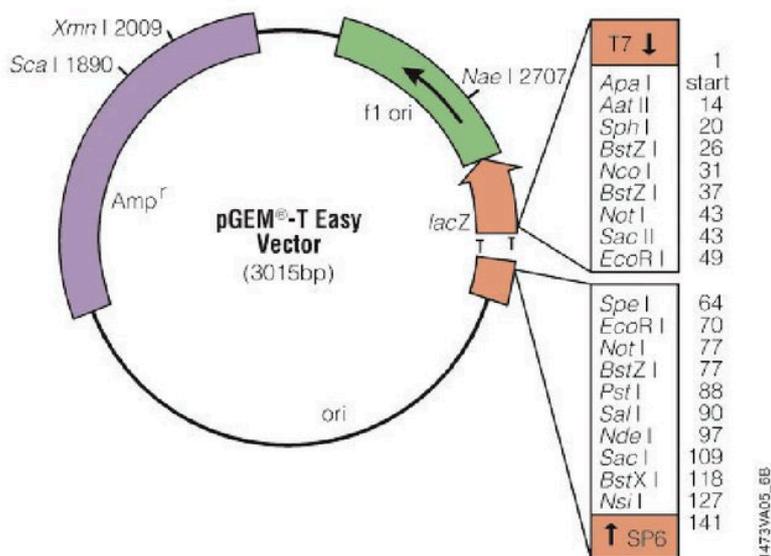
Um die Ergebnisse ablesen zu können, wurden 3 µl jedes PCR-Produkts mit 2 µl Gel Loading Dye Purple (6X) (NEB, USA) gemischt und in die Kammern des vorbereiteten Gels überführt. Durch den Vergleich mit einem Größenstandard (1 kbp DNA-Leiter, Fa. Roth) konnte die Länge der DNA-Fragmente bestimmt werden.

### **2.2.7 Reinigung der DNA**

Zur Kontrolle der Spezifität der PCR wurde das PCR-Produkt auf ein Gel aufgetragen. Ist mehr als ein PCR-Produkt entstanden, wurde die entsprechende Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und die DNA mit dem Gelaufreinigungs kit (NEB) gereinigt. Ansonsten wurden die PCR Amplicons direkt mit dem QIAquick PCR Purification Kit® (Qiagen, Hilden, D) aufgereinigt, um sie von Fremdmaterial zu befreien. Durch die Bindung der DNA an die Säule können Verunreinigungen wie Agarose und Salz, aber auch Primer, Nukleotide und Enzyme entfernt werden. Anschließend wurden die gereinigten PCR Produkte in H<sub>2</sub>O eluiert.

## 2.2.8 Ligation und Transformation in den T-Vektor

Nach Überprüfung der aufgereinigten PCR Amplicons mittels Sanger Sequenzierung, wurden die PCR-Produkte in ein T-Vektor-Backbone (pGEM T-easy<sup>®</sup>, Promega, Fitchburg, USA) eingefügt (Abbildung 6). Voraussetzung für die Ligation in einen T-Vektor ist, dass das Insert ein überhängendes Desoxyadenosin besitzt, welches durch die templateunabhängige Mithilfe einer Taq Polymerase während der PCR-Reaktion angehängt wird. Zur Ligation des Inserts mit dem Vektor wurde der T/A Blunt Ligations MM<sup>®</sup> (NEB, MA, USA) verwendet. Mithilfe der Ligase kann somit das Insert mit dem T-Vektor, der ein komplementäres Desoxythymidin aufweist, zu einem Plasmid ligiert werden. Danach wurde der Ligationsansatz in kompetente *Escherichia coli* (Stamm: HB101) transformiert. Unter einer Transformation versteht man die Aufnahme von DNA durch Bakterien. Dazu wurden kompetente *E. coli* auf Eis aufgetaut und 50 µl zur Ligation pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von etwa 30 Minuten auf Eis folgt der Hitzeschock bei 37°C für 90 sek. Im Anschluss wird der Ansatz wieder für 1 min auf Eis gekühlt, danach 450 µl ampicillinfreies LB-Medium hinzugegeben und für 20 min bei 37°C im Thermomixer geschüttelt. Der Transformationsansatz wurde danach auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen, die 50 µg/ml Ampicillin enthielten und anschließend 24 h bei 37°C inkubiert.



**Abbildung 7:** Schematische Darstellung eines pGEM-T Vektors zur Klonierung von PCR-Produkten der Firma Promega

### **2.2.9 Generierung der Positivkontrolle**

Als Grundlage für den Einsatz der entwickelten RT-qPCR in der Diagnostik und zu Validierungszwecken (Bestimmung der Sensitivität) wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Plasmid Positivkontrolle generiert. Dazu wurden die von LABOKLIN GmbH & Co als positiv bestätigten Originalproben erneut am Institut für Virologie laut Protokoll extrahiert und mit dem oben beschriebenen RT-PCR Protokoll untersucht. Bei der PCR Reaktion wurden unterschiedliche Annealing Temperaturen der Primer (50°C und 55°C) ausprobiert. In Spalte 1 wurde eine Einzelprobe als Template verwendet und in Spalte 2 ein Probenpool aus mehreren positiv getesteten Tieren mit einer Primer Annealing Temperatur von 50 °C untersucht. In Spalte 3 wurde eine Einzelprobe und in Spalte 4 ein Probenpool aus mehreren positiv getesteten Tieren mit einer Primer Annealing Temperatur von 55 °C untersucht.

Nach der erfolgreichen Amplifikation der Proben mit einer Taq-Polymerase wurde das Insert in einen T-Vektor ligiert. Dazu wurde die PCR Bande des Einzeltieres (Gelspur 1) ausgewählt und mittels PCR Aufreinigungskit (NEB) gereinigt, in 12 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und nach Protokoll mit dem kommerziellen T-Vektor ligiert und in kompetente *E. coli* transformiert. Nach einer Inkubation der Platten wurden sechs Klone angezogen, eine Mini-DNA präpariert und ein Test-Verdau der Mini-DNA mit dem Enzym EcoRI angesetzt.

Vom Klon pL592#6 wurde im Anschluss eine Midipräparation angesetzt, um eine größere Menge an sauberer DNA zu gewinnen. Außerdem wurde dieser Klon sequenziert, eine Konsensus-Sequenz des N-Proteins erstellt und im Anschluss mit Nucleotide BLAST (NCBI Blast – National Center for Biotechnology Information) analysiert.

### **2.2.10 Isolierung von Plasmid DNA**

#### **2.2.10.1 Minipräparation**

Nach der Transformation und der Inkubation der Agarplatten wurde eine Minipräparation durchgeführt, um jene Klone zu identifizieren, die das gewünschte Insert enthalten. Dafür wurden jeweils 2,5 ml ampicillinhaltiges LB-Medium in Reagenzgläser vorgelegt. Das LB-

Flüssigmedium bestand aus 10 g/l Bactotrypton, 5 g/l Bactohefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, und wurde mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Der pH-Wert des LB-Mediums betrug 7,5.

Mit einer Pipettenspitze wurden 6 Bakterienkolonien entnommen und zu den 2,5 ml Medium gegeben. Dabei wurde stets darauf geachtet nur große Kolonien und keine kleineren Satellitenkolonien zu entnehmen. Die Inkubation erfolgte für 6 Stunden im Schüttelinkubator bei 37 °C und 160 U/min.

Für die Plasmidpräparation wurden zunächst 2 ml aus der Bakterienkultur in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 1 min lang bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Vakuumpumpe abgesaugt und verworfen. Es wurden 200 µl von der Pufferlösung P1 (10 mM EDTA, 100 mg/l RNase A, 50 mM Tris/HCl, pH 8) hinzupipettiert und anschließend wurde das Eppendorfgefäß auf einem Gitter geratscht. Dann wurden 200 µl von der Pufferlösung P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) hinzugefügt und das Eppendorfgefäß wurde vorsichtig invertiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Schlussendlich wurden 200 µl von der Pufferlösung P3 (2,8 mM Kaliumacetat, pH 5,1) hinzugegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 5 min bei 13000 U/min zentrifugiert, der Überstand ohne weißen Niederschlag abgehoben und zu 500 µl Isopropanol in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße gegeben. Nach vorsichtigem Schwenken wurde die Probe 1 min lang bei 13000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Vakuumpumpe abgesaugt und es wurden 100 µl 70%iges Ethanol zum Pellet gegeben. Es wurde erneut 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Eppendorfgefäße wurden mit offenem Deckel in den Heizblock bei 37 °C gestellt damit das restliche Ethanol verdampfen konnte. Anschließend wurde zu jedem Pellet 25 µl RNase freies Wasser pipettiert und die Proben im Heizblock bei 37 °C 10 min lang mit 700 U/min geschüttelt und anschließend erneut gevortext, um das DNA Pellet zu resuspendieren (Vortex-Genie 2, Scientific Industries, USA).

#### **2.2.10.2 Midipräparation**

Zur Gewinnung größerer und sauberer Plasmidmengen wurde eine Midipräparation durchgeführt. Es wurden 100 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit den Bakterienkulturen angesetzt, die nach dem Test-Verdau der Minipräparation die erwarteten Banden gezeigt hatten.

Die Kultur wurde über Nacht im Schüttelinkubator bei 37 °C und 160 U/min inkubiert. Die Reinigung der DNA erfolgte mit einem Plasmid-Präparationskit (Favorgen Biotech Corp., Ping-Tung, Taiwan).

Zunächst wurden 50 ml von der Kultur 10 min bei 5000 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Es wurde 1 ml der Solution I (RNase) zugegeben und gemischt. Danach wurden 200 µl der Solution II hinzugefügt und vorsichtig geschwenkt. Nach der Zugabe von 700 µl Solution III wurde die Probe erneut vorsichtig geschwenkt. Es bildete sich ein weißes Präzipitat, das bei Raumtemperatur (10 min, 13000 U/min) inkubiert wurde. Die Perfect Bind DNA Säulen wurden mit den 2 ml „Collection Tubes“ zusammengesteckt. Anschließend wurde nach Zugabe der Komponente 20-30 sek bei 10000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert, der Durchfluss verworfen und die nächste Komponente aufgetragen, zuerst 800 µl des klaren Überstandes, dann der restliche klare Überstand und 500 µl PW Plasmid Puffer.

Anschließend wurden noch zweimal hintereinander 750 µl 100% Ethanol DNA Waschpuffer aufgetragen und 1 min lang zentrifugiert. Danach wurde 2 min bei 10000 U/min trocken zentrifugiert und die Säule in ein sauberes 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben. Zum Schluss wurden 100 µl RNase freies Wasser zugegeben und die DNA bei 5000 U/min während 1 min ins Eppendorfgefäß zentrifugiert.

### **2.2.11 Restriktionsverdau**

Zur Überprüfung der isolierten Plasmid-DNA, wurde ein Testverdau angesetzt. Dabei wird die DNA an bestimmten Sequenzen von Restriktionsendonukleasen geschnitten. Im verwendeten T-Vektor wird die T/A Klonierungsstelle von zwei Schnittstellen für das Enzym EcoRI flankiert. Daher wurde immer dieses Enzym für den Testverdau verwendet.

Der Mastermix wurde wie folgt hergestellt:

Nuklease-freies Wasser	6,7 $\mu$ l
10x Puffer NEB 3.1	1 $\mu$ l
Restriktionsenzym EcoRI (NEB)	0,3 $\mu$ l
Plasmid-DNA	2 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

Auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte wurden 8  $\mu$ l Mastermix mit 2  $\mu$ l der Plasmid-DNA gemischt und anschließend mit einem Klebefilm (Tixo<sup>®</sup> oder Tesafilm<sup>®</sup>) zugeklebt. Die Testplatte wurde 45 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die Proben in ein Agarosegel überführt. In die erste Tasche wurden 3  $\mu$ l der 1 kbp Ladder (Fa. Roth) aufgetragen. Die verdaute Plasmid-DNA wurde in die anderen Taschen aufgetragen und es wurden jeweils 2  $\mu$ l Gel Loading Dye Purple (6X) (NEB, USA) hinzupipettiert. Die Gelelektrophorese (Mupid-One, Advance, Japan) lief bei 100 V für 30 min und wurde anschließend mit dem Bio Spectrum (UVP Bioimaging Systems, USA) abgelichtet. Die positiven Klone konnten anschließend zur Sequenzierung oder Midipräparation verwendet werden.

### 2.2.12 Sanger Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte wurde durch die Firma Eurofins (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Dazu wurden je 6  $\mu$ l des PCR-Produktes und 2  $\mu$ l Primer (10  $\mu$ M) mit 10  $\mu$ l RNase-freiem Wasser aufgefüllt und im Smart2Seq Kit verschickt. Besondere Vorkehrungen wie die Kühlung der versendeten Proben, waren nicht notwendig.

Das T-Vektor-Plasmid mit der sequenzierten DNA-Zielsequenz wurde als Positivkontrolle generiert und als pL592 bezeichnet. Die Sequenzierung wurde mit Plasmid-Midi-DNA und mit Standard-Oligonukleotiden (M13 und M13rev) wiederholt, um qualitativ hochwertige Ergebnisse zu gewährleisten. Die Analyse der Sequenz erfolgte mit dem Programm CLC Sequence Viewer Version 11.0.1 (QIAGEN, Hilden, Deutschland).

### 2.2.13 Primer Design

Die Oligonukleotide SNVqforw28857, SNVqrev28937 und SNVprobe28879, sowie NVNforw28644 und NVNrev29079 wurden auf der Grundlage des Referenzgenoms *Morelia viridis* nidovirus strain S14-1323\_MVNV (Genbank MF351889.1) entwickelt.

### 2.2.14 RT-qPCR

Die viralen Genomäquivalente (GEs) wurden mithilfe einer sondenbasierten („TaqMan“) RT-qPCR in einem Rotor-Gene Q<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) bzw. in einem Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Thermocycler<sup>®</sup> (Applied Biosystems, Foster City, USA) quantifiziert. Dazu wurden die SNV-spezifischen Primer SNVqforw28857 (5'-CAAGAASMGCCAGAGAGTTGC-3') und SNVqrev28937 (5'-TTGACRTRCGTGGGTRAGT-3') und die FAM/TAMRA-markierte Sonde SNVprobe28879 (5'-Fam-TGCARCCRACTCTYGASTCTGACGT-TamRa-3') verwendet.

Bei der RT-qPCR wurde folgendes Protokoll angewendet: 5 min Inkubation bei 50 °C (Reverse Transkription), 5 min Inkubation bei 95 °C Inkubation, 40 Zyklen mit jeweils 95 °C für 15 Sekunden (Denaturierung) und 60 °C für 1 min (Primer Annealing, Elongation und Messen des Fluoreszenzsignals).

Für einen PCR Ansatz von 25 µl wurde der Mastermix mit dem Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit<sup>®</sup> (NEB, Ipswich, USA) wie folgt hergestellt:

Luna Universal Probe One-Step Reaction Mix (2x)	12,5 µl
Luna WarmStart RT Enzyme Mix (20x)	1 µl
Forward Primer (NVNforw28644; 10 µM)	1 µl
Reverse Primer (NVNrev29079; 10 µM)	1 µl
Template RNA	2 µl
Nuklease-freies Wasser	7,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25 µl</b>

### 2.2.15 Validierung der RT-qPCR

Zur Evaluierung der Sensitivität und Effizienz der PCR, wurde eine Verdünnungsreihe des generierten Plasmidstandards (pL592) angefertigt (Abbildung 11). Anschließend wurden jeweils 1:10 Verdünnungen hergestellt, um das Detektionsminimum definieren zu können.

Mit der dezimalen Verdünnungsreihe des Plasmid Standards konnte die Sensitivität und Effizienz der entwickelten RT-qPCR bestimmt werden. Dabei wurden jeweils 180 µl Nuklease-freies Wasser in 1,5ml Eppendorf Reaktionsgefäße vorgelegt und je 20 µl der vorherigen Verdünnung bzw. des Originalplasmids hinzugefügt und gevortext. Jeweils 1 µl jeder Verdünnung wurden in der PCR Reaktion eingesetzt und die PCR wurde mit dem o.g. Temperaturschema am Rotor-Gene Q<sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) durchgeführt. Zur Berechnung der Parameter der qPCR wurde die Rotor Gene Q Software (Qiagen) verwendet.

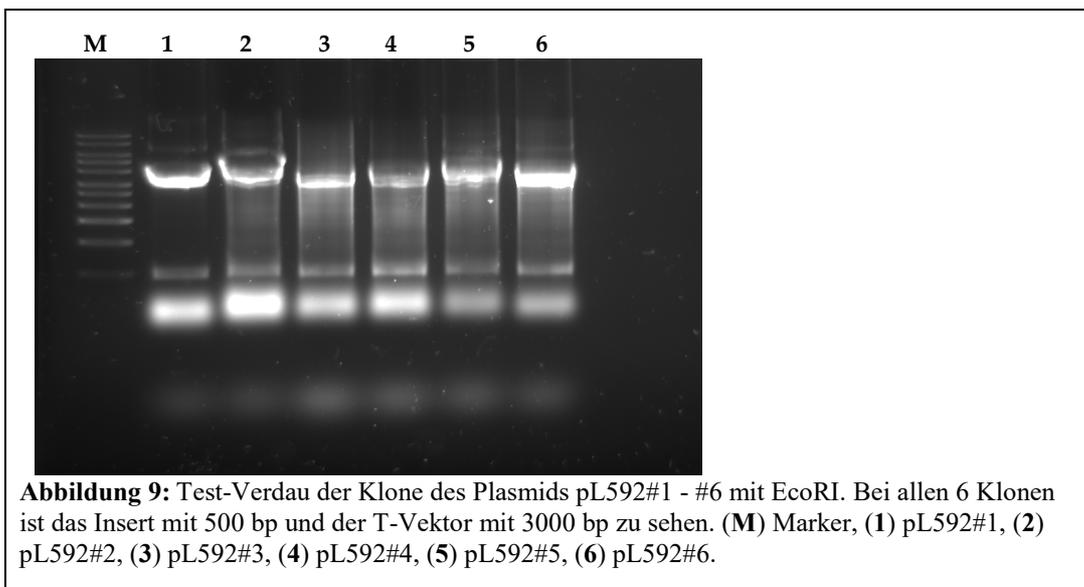
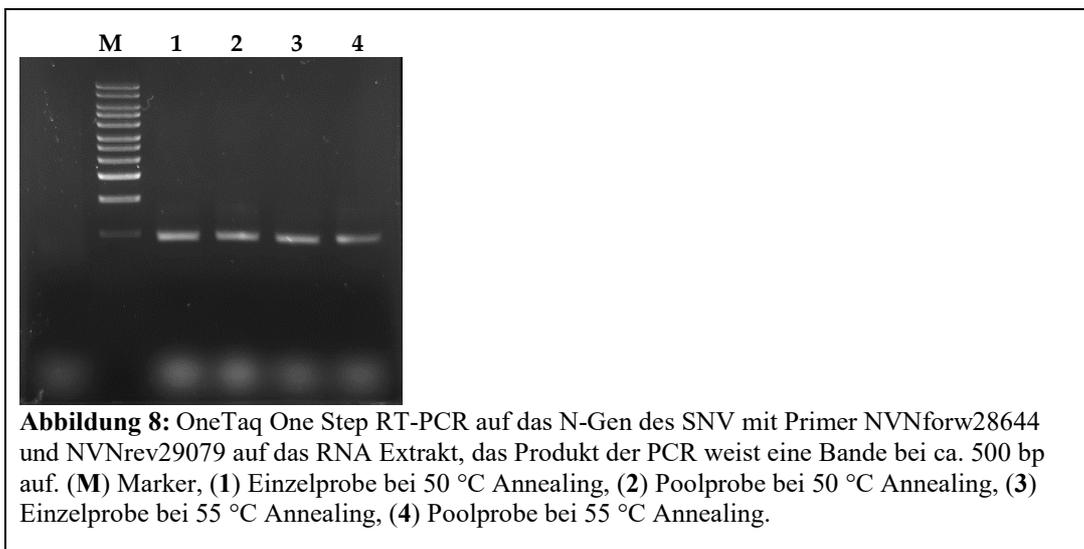
Die viralen Genomäquivalente wurden mithilfe eines DNA Plasmidstandards quantifiziert. Dazu wurde die Midipräparation des sequenzierten pL592 verwendet. Mit dem Spektralphotometer NanoVue Plus (Biochrom LTD, Cambridge, England) wurde ein DNA-Gehalt von 322 ng/µl gemessen.

Die Kopienzahl der rekombinanten DNA wurde nach folgender Formel berechnet:  $N$  (Moleküle pro µl) =  $(C \text{ (DNA-Konzentration in } \mu\text{g}/\mu\text{l)}) / K \text{ (Fragmentgröße in bp)} \times 185,5 \times 10^{13}$  (Faktoren, die sich aus DNA-Gewicht, Volumen und der Avogadro-Konstante ableiten) (URI Genomics & Sequencing Center <http://cels.uri.edu/gsc/cndna.html> (Zugriff 09.11.2020)). Für das Plasmid pL592 bei einer Konzentration von 322 ng/µl und bei einer Größe von 3474 bp ergab sich daher eine Kopienanzahl von  $1,7 \times 10^{10}$  Moleküle/µl.

### 3. Ergebnisse

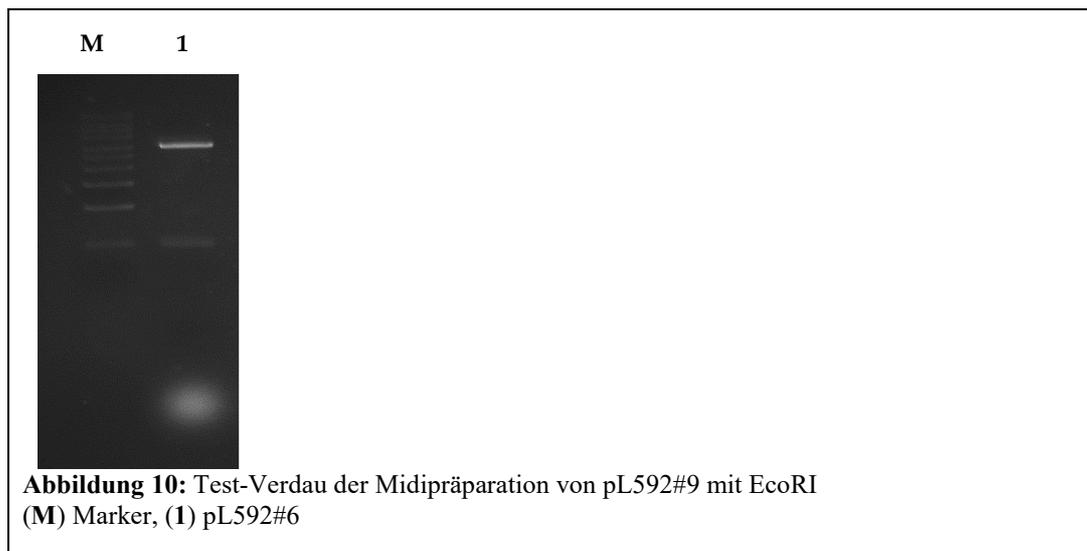
#### 3.1 Generierung der Positivkontrolle

Die RT-PCR auf Einzelproben bzw. Poolproben ergab in allen Fällen ein positives Ergebnis (Abbildung 8). Die Auswertung des Agarosegels zeigt nach der Klonierung in den T-Vektor und dem Testverdau, dass alle sechs Klone ein Insert mit passender Größe (500 bp) aufgenommen haben. Die Bande bei 3 kb zeigt jeweils den T-Vektor an (Abbildung 9).



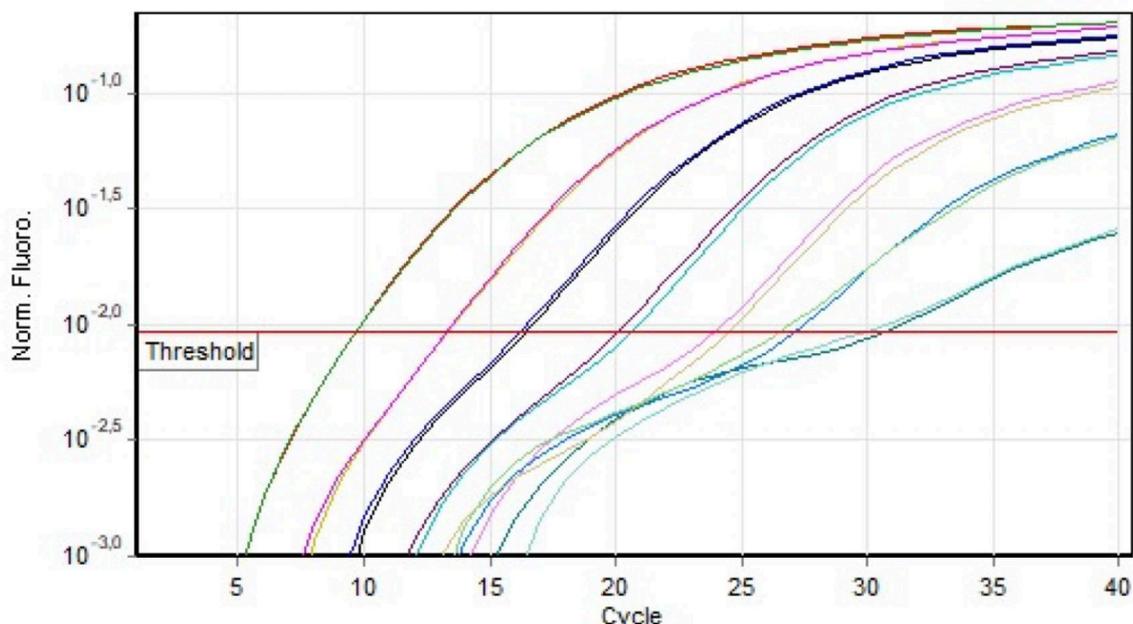
In der Midipräparation des Klons pL592#6 wurde eine größere Menge an sauberer DNA gewonnen (Abbildung 10).

Um das Insert zusätzlich zu verifizieren, wurde der Klon pL592#6 sequenziert. Dabei konnte die größte Übereinstimmung mit 96,07% zu einem amerikanischen Nidovirus-Isolat (Genbank Nr. MN161560.1) gefunden werden).



### 3.2 Validierung der RT-qPCR

Bei der angefertigten Verdünnungsreihe (Abbildung 11) wurde mit einer Verdünnung von 1:100 begonnen, da in den ersten Versuchen eine zu hohe Konzentration an Plasmid-DNA die Kurven negativ beeinträchtigt hat.



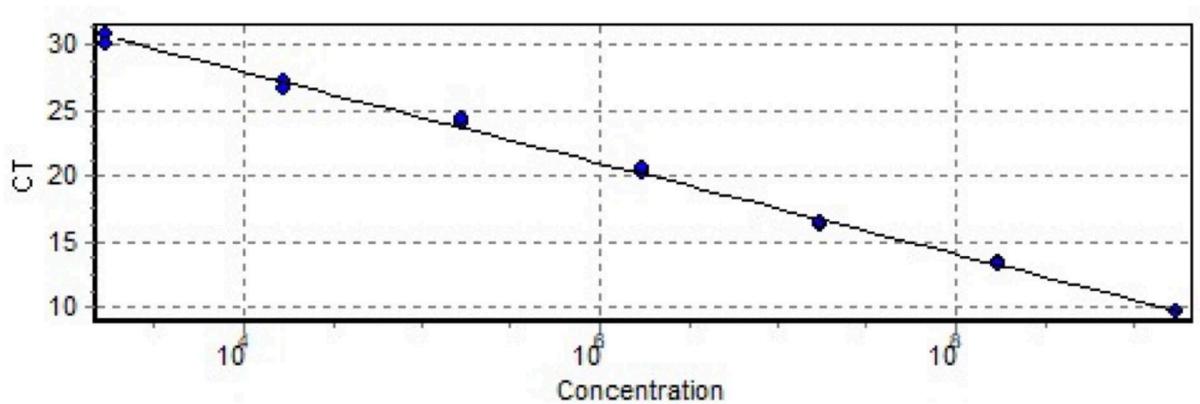
**Abbildung 11:** Verdünnungsreihe des Standards – Die 7 Kurven zeigen die Amplifikate der Verdünnungsreihe  $10^{-2}$  bis  $10^{-8}$ , die entsprechend ihrer Ausgangs-DNA-Konzentration im Amplifikationsplot bei unterschiedlichen Zyklen ansteigen. Die Verdünnungsreihe wurde dabei als Duplikat mit dem Rotor-Gene Q® (Qiagen, Hilden, Deutschland) angefertigt.

**Tabelle 4:** Verdünnungsreihe des Standards. Das Plasmid pL592#6 wurde in einer Verdünnungsreihe von  $10^{-2}$  bis  $10^{-9}$  als Duplikat angefertigt.

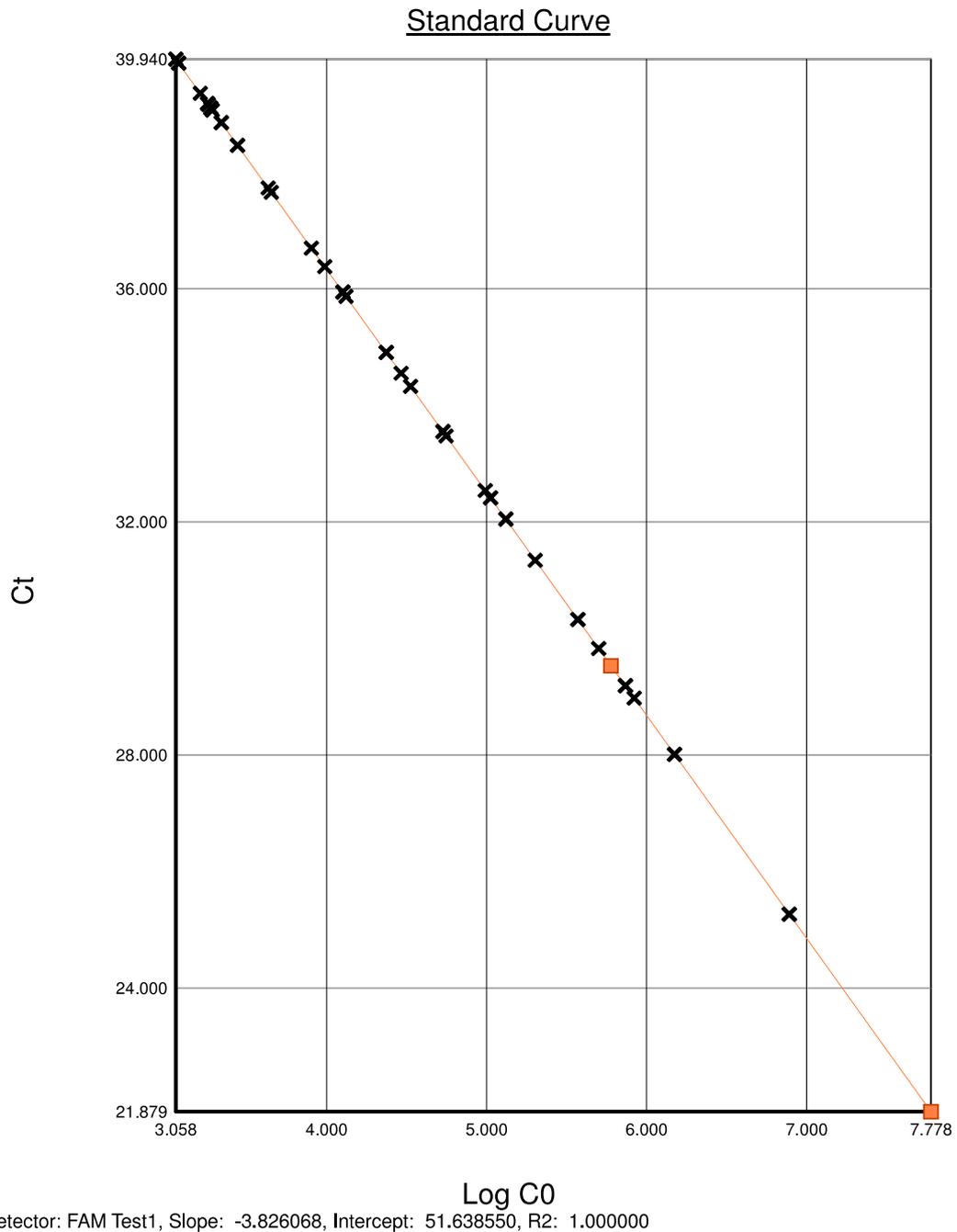
No.	Color	Name	Type	Ct	Ct Comment	Given Conc (Copies)
1	Red	Standard pL592 -2	Standard	9,70		1,70E+09
2	Yellow	Standard pL592 -3	Standard	13,41		1,70E+08
3	Blue	Standard pL592 -4	Standard	16,24		1,70E+07
4	Purple	Standard pL592 -5	Standard	20,16		1,70E+06
5	Pink	Standard pL592 -6	Standard	23,98		1,70E+05
6	Light Blue	Standard pL592 -7	Standard	27,19		1,70E+04
7	Teal	Standard pL592 -8	Standard	30,80		1,70E+03
8	Light Red	Standard pL592 -9	Unknown		NEG (R.Eff)	
9	Green	Standard pL592 -2	Standard	9,72		1,70E+09
10	Magenta	Standard pL592 -3	Standard	13,34		1,70E+08
11	Black	Standard pL592 -4	Standard	16,42		1,70E+07
12	Cyan	Standard pL592 -5	Standard	20,68		1,70E+06
13	Gold	Standard pL592 -6	Standard	24,49		1,70E+05
14	Light Green	Standard pL592 -7	Standard	26,57		1,70E+04
15	Light Teal	Standard pL592 -8	Standard	30,10		1,70E+03
16	Light Blue	Standard pL592 -9	Unknown		NEG (R.Eff)	
17	Purple	Negativkontrolle	NTC		NEG (R.Eff)	
18	Pink	Negativkontrolle	NTC		NEG (R.Eff)	

Tabelle 4 listet die Ergebnisse der Verdünnungsreihe des Standards auf: Die letzte Verdünnung  $10^{-9}$  erreicht den Treshold nicht mehr und somit liegt das Detektionslimit bei  $1,70E+03$ . Hieraus folgt, dass 1000 Genomäquivalente im Reaktionsansatz mit 30,8 resp. 30,1 Cq nachgewiesen werden konnten.

Ein wichtiger Parameter für die Bewertung der Effizienz der RT-qPCR ist der  $R^2$ -Wert, ein statistischer Ausdruck, der angibt, wie gut ein Wert einen anderen vorhersagen kann. Der  $R^2$ -Wert beschreibt die Linearität und liegt bei 0,997. Die Steigung beschreibt die Effizienz der RT-qPCR und liegt bei -3,469. Mit der Formel  $10^{(-1/\text{Steigung})}-1$  erhält man eine Effizienz von 94,2% (Abbildung 13).



**Abbildung 12:** Die RT-qPCR Standard Kurve der Verdünnungsreihe ergibt einem  $R^2$ -Wert von 0,997 und eine Steigung von -3,469. Die Effizienz beträgt 94,2%.



**Abbildung 13:** Die Standardkurve der RT-qPCR Proben die auf das Schlangen-Nidovirus getestet wurden. Die Proben wurden mit dem Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) quantifiziert.

### 3.3 RT-qPCR Ergebnisse

Die Ergebnisse der RT-qPCR mit Gegenüberstellung des Probenmaterials und der klinischen Symptomatik zum Zeitpunkt der Anamnese sind in Tabelle 5 ersichtlich. Dabei ergibt sich folgende Nomenklatur für die Identifikation der einzelnen Individuen: Die Zahl „1-83“ stellt die einzelnen Individuen dar und die Großbuchstaben „A-M“ bezeichnen jeweils einen Bestand. Die Kleinbuchstaben bezeichnen die unterschiedlichen Proben, die bei den einzelnen Tieren aus dem Bestand A untersucht wurden. Eine Infektion mit Nidoviren konnte mit der RT-qPCR bei 8/13 Zuchten nachgewiesen werden.

In der Population A wurden alle Tiere während der Studienzeit positiv getestet. Es ist der einzige Bestand, der wiederholt auf SNV getestet wurde. Über den Zeitraum der Untersuchungen (April 2018, Februar 2019 und Juni 2019) war der Virusnachweis bei 3/8 Tieren nicht konstant (A2, A5 und A6).

Im April 2018 wurden 7/8 Tiere über orale Abstriche positiv getestet. Kotproben bzw. Kloakaltupfer standen im April 2018 nicht als Probenmaterial zur Verfügung. Im Februar 2019 wurden 5/8 derselben Tiere positiv getestet; bei 2 Tieren waren die oralen Abstriche positiv, während das Virus in 3 weiteren Fällen ausschließlich über den Kot nachgewiesen werden konnte. Alle 5 Tiere, die im Februar 2019 positiv getestet wurden, waren bereits im April 2018 positiv und bei allen 5 Tieren konnten in den Maultupfern von 2018 mehr GE/ $\mu$ l RNA nachgewiesen werden, als 2019. Alle Serum- und Plasmaproben, die im Februar 2019 analysiert wurden, waren negativ. In der vorliegenden Studie erwiesen sich Serum und Plasma generell als ungeeignet um eine Infektion mit SNV zu detektieren. Im Februar 2019 gab es bei 5 auswertbaren Vergleichen zwischen Kot und Maultupfer (Tier 1A, 2A, 3A, 4A und 8A) nur eine einzelne Übereinstimmung bei Tier 2A (beide Proben waren negativ). Bei den restlichen 4 Tieren fiel das Ergebnis im Februar 2019 gegengleich aus: 2/5 Kotproben wurden bei Tier 3A und 8A positiv getestet, während die Maultupfer negative Ergebnisse lieferten. 2/5 Maultupfer wurden bei Tier 1A und 4A positiv getestet, während die Kotproben negative Ergebnisse lieferten.

Zusätzlich zu den oralen Abstrichen im Juni 2019 wurde erneut Kot von den Schlangen der Zucht A analysiert. Eine Ausnahme stellte das Tier 6A, für das kein Kot im besagten Zeitraum verfügbar war. Alle Proben (orale Abstriche und Kot) der Schlangen der Population A waren bei dieser Untersuchung im Juni 2019 positiv.

Während des Beobachtungszeitraums von 21 Monaten nach dem ersten positiven PCR-Ergebnis, zeigten bis auf ein Tier (Tier 1A) alle Tiere der Zucht A unterschiedliche Grade an seröser Schleimsekretion aus dem Maul, begleitet von Atemgeräuschen und unterschiedlichen Ausprägungen einer Dyspnoe. Zwei Tiere (Tier A4 und A6) durchliefen eine überaus lange anorektische Phase von 38 bzw. 52 Wochen, bei A6 begleitet von einer längeren Zeitspanne von 45 Wochen während der sich das Tier nicht gehäutet hat. Dasselbe Tier zeigte in drei von vier Fällen Störungen bei der Häutung (Dysecdysis). Bei der klinischen Untersuchung, die der Probenentnahme vorausging, waren drei Tiere klinisch unauffällig (Tier A1, A3 und A5), während die anderen fünf Tiere unterschiedliche Grade von schleimigem Speichelfluss und Atemgeräuschen aufwiesen. Keine der Schlangen zeigte offensichtliche Anzeichen einer Stomatitis oder Pharyngitis. Es waren keine eitrigen oder diphtheroiden Beläge im Oropharynx feststellbar.

In den Populationen B, C und D wurde jeweils ein Tier positiv getestet (n=18, n=6, n=2). 4/4 Tiere der Population F, 3/9 Tiere der Population H, 10/11 Tiere der Population I und 7/9 Tiere der Population J wurden positiv auf Nidovirus getestet. Alle Tiere aus den Populationen E, G, K, L und M waren negativ (n=4, n=2, n=2, n=6, n=2).

In 5 Beständen (A, F, G, I, J) wurde bereits bei der Anamnese auf intermittierende Krankheitssymptome wie erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe, Anorexie oder Stomatitis hingewiesen. 4/5 Bestände wurden positiv auf das Schlangen-Nidovirus getestet. Die Atemgeräusche der zwei negativ getesteten Königspythons (Population G) konnten auf suboptimale Haltungsbedingungen mit einer zu kalten Nachtabsenkung zurückgeführt werden. In 8 Beständen (B, C, D, E, H, K, L, M) gab es keine vorberichtlichen Auffälligkeiten, allerdings wurden in 4/8 (50%) dieser Bestände mindestens ein positiver Fall diagnostiziert.

Während 2 klinisch auffällige Tiere (41F, 42F) über den Zeitraum der Untersuchungen verstorben sind, konnten 7 klinisch unauffällige Tiere (1A, 23B, 30C, 33D, 45H, 48H, 50H) positiv auf SNV getestet werden. Bei diesen klinisch unauffälligen Tieren kann von einer latenten Infektion gesprochen werden (Tabelle 5).

Insgesamt wurden 35/83 Schlangen (42,2%) positiv auf SNV getestet, darunter 34/71 (47,89 %) Pythons und 1/12 (8,33%) Boas. Die höchste Viruslast konnte über einen Mantupfer bei einer klinisch gesunden Regenbogenboa (*Epicrates cenchria*) (23B) mit  $10^7$  GE/ $\mu$ l RNA nachgewiesen werden (Tabelle 5). Serum- und Plasmaproben hingegen sind grundsätzlich keine geeigneten Probenmaterialien für den Nachweis von Nidoviren.

Die RT-qPCR ist eine sehr sensitive Methode, bei der bereits geringste Virusausscheidungen zu einem positiven Ergebnis führen. Im Reaktionsansatz konnten bei 30,8 resp. 30,1 Zyklen noch 1000 Genomäquivalente zuverlässig nachgewiesen werden.

**Tabelle 5:** Insgesamt wurden 128 Proben von 83 unterschiedlichen Schlangen untersucht und mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit RT-PCR auf Nidovirus getestet.

Proben ID	Schlangenart	Datum	Probenmaterial	q-PCR Ergebnis	Ct	Menge (GE/ $\mu$ l RNA)	Klinische Symptome
1Aa	Morelia viridis	April 2018	Maultupfer	positiv	24,61	6,1E+05	unauffällig
1Ab	Morelia viridis	Februar 2019	Maultupfer	positiv	38,9	2,2E+03	
1Ac	Morelia viridis	Februar 2019	Kloakaltupfer	nicht detektierbar			
1Ad	Morelia viridis	Februar 2019	Kot	nicht detektierbar			
1Ae	Morelia viridis	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			
1Af	Morelia viridis	Juni 2019	Maultupfer	positiv	24.15	1,0E+05	
1Ag	Morelia viridis	Juni 2019	Kot	positiv	27.03	1,0E+04	
2Aa	Morelia viridis	April 2018	Maultupfer	nicht detektierbar			Erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe
2Ab	Morelia viridis	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
2Ac	Morelia viridis	Februar 2019	Kloakaltupfer	nicht detektierbar			
2Ad	Morelia viridis	Februar 2019	Kot	nicht detektierbar			
2Ae	Morelia viridis	Februar 2019	Serum	nicht detektierbar			
2Af	Morelia viridis	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			
2Ag	Morelia viridis	Juni 2019	Maultupfer	positiv	24.25	1,0E+05	
2Ah	Morelia viridis	Juni 2019	Kot	positiv	26.96	1,0E+04	
3Aa	Morelia viridis	April 2018	Maultupfer	positiv	25,61	3,5E+05	Erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe
3Ab	Morelia viridis	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
3Ac	Morelia viridis	Februar 2019	Kloakaltupfer	nicht detektierbar			
3Ad	Morelia viridis	Februar 2019	Kot	positiv	32,5	9,8E+04	
3Ae	Morelia viridis	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			
3Af	Morelia viridis	Juni 2019	Maultupfer	positiv	23.20	3,0E+06	
3Ag	Morelia viridis	Juni 2019	Kot	positiv	30.38	1,0E+03	
4Aa	Morelia viridis	April 2018	Maultupfer	positiv	24,43	6,7E+05	Erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe, Anorexie
4Ab	Morelia viridis	Februar 2019	Maultupfer	positiv	39,4	1,6E+03	
4Ac	Morelia viridis	Februar 2019	Kloakaltupfer	nicht detektierbar			
4Ad	Morelia viridis	Februar 2019	Kot	nicht detektierbar			
4Ae	Morelia viridis	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			

<b>4Af</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Maultupfer	positiv	21.25	1,0E+06	
<b>4Ag</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Kot	positiv	27.72	1,5E+04	
<b>5Aa</b>	<i>Morelia viridis</i>	April 2018	Maultupfer	positiv	29,14	4,8E+04	Erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe
<b>5Ab</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>5Ac</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Serum	nicht detektierbar			
<b>5Ad</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			
<b>5Ae</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Maultupfer	positiv	32.99	1,0E+02	
<b>5Af</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Kot	positiv	36.50	<1,0E+01	
<b>6Aa</b>	<i>Morelia viridis</i>	April 2018	Maultupfer	positiv	25,61	3,5E+05	Erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe, Anorexie
<b>6Ab</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>6Ac</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Serum	nicht detektierbar			
<b>6Ad</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			
<b>6Ae</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Maultupfer	positiv	38,46	<1,0E+01	
<b>7Aa</b>	<i>Morelia viridis</i>	April 2018	Maultupfer	positiv	25,2	4,3E+05	Erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe,
<b>7Ab</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Kot	positiv	29,5	6,0E+05	
<b>7Ac</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Serum	nicht detektierbar			
<b>7Ad</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			
<b>7Ae</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Maultupfer	positiv	23.03	1.5E+05	
<b>7Af</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Kot	positiv	22,24	2,0E+05	
<b>8Aa</b>	<i>Morelia viridis</i>	April 2018	Maultupfer	positiv	26,61	2,0E+05	Erhöhte Schleimsekretion, Atemgeräusche, Dyspnoe,
<b>8Ab</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>8Ac</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Kot	positiv	29,2	7,4E+05	
<b>8Ad</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Serum	nicht detektierbar			
<b>8Ae</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Plasma	nicht detektierbar			
<b>8Af</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Maultupfer	positiv	27.78	1,0E+04	
<b>8Ag</b>	<i>Morelia viridis</i>	Juni 2019	Kot	positiv	29.86	1,0E+03	
<b>9B</b>	<i>Boa constrictor</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			unauffällig
<b>10B</b>	<i>Boa constrictor</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>11B</b>	<i>Boa constrictor</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>12B</b>	<i>Acrantophis dumerili</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>13B</b>	<i>Acrantophis dumerili</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>14B</b>	<i>Acrantophis dumerili</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>15B</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			

<b>16B</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>17B</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>18B</b>	<i>Morelia spilota</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>19B</b>	<i>Morelia spilota</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>20B</b>	<i>Morelia spilota</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>21B</b>	<i>A. madagascariensis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>22B</b>	<i>Epicrates cenchria</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>23B</b>	<i>Epicrates cenchria</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	21,9	6,0E+07	
<b>24B</b>	<i>Liasis mackloti</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>25B</b>	<i>Liasis mackloti</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>26B</b>	<i>S. madagascariensis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>27C</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			unauffällig
<b>28C</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>29C</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>30C</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	37,7	4,3E+03	
<b>31C</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>32C</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>33D</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	30,3	3,7E+05	unauffällig
<b>34D</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>35E</b>	<i>Morelia carinata</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			unauffällig
<b>36E</b>	<i>Morelia carinata</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>37E</b>	<i>Morelia carinata</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>38E</b>	<i>Morelia carinata</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>39F</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	32,0	1,3E+05	Oraler Schleimausfluss, Anorexie
<b>40F</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	25,3	7,8E+06	Stomatitis, Anorexie
<b>41F</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	35,9	1,3E+04	Stomatitis, Anorexie, verstorben
<b>42F</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	39,1	1,9E+03	Anorexie, verstorben
<b>43G</b>	<i>Python regius</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			Atemgeräusch
<b>44G</b>	<i>Python regius</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			Atemgeräusch
<b>45H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	39,9	1,2E+03	unauffällig
<b>46H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			

<b>47H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>48H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	33,5	5,3E+04	
<b>49H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>50H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	39,9	1,1E+03	
<b>51H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>52H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>53H</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>54I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	34,9	2,4E+04	Vereinzelte Tiere zeigten hin und wieder vermehrten oralen Schleimausfluss und Anorexie.
<b>55I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	38,5	2,8E+03	
<b>56I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	28,0	1,5E+06	
<b>57I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	39,2	1,8E+03	
<b>58I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	32,4	1,1E+05	
<b>59I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	37,7	4,5E+03	
<b>60I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>61I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	36,7	8,0E+03	
<b>62I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	29,8	5,0E+05	
<b>63I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	29,0	8,4E+05	
<b>64I</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	39,1	1,9E+03	
<b>65J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	36,4	9,7E+03	Intermittierende Todesfälle im Bestand. Einige Tiere zeigten hin und wieder vermehrten oralen Schleimausfluss und Anorexie.
<b>66J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	39,2	1,8E+03	
<b>67J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	34,3	3,3E+04	
<b>68J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>69J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>70J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	35,9	1,3E+04	
<b>71J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	34,6	2,9E+04	
<b>72J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	31,3	2,0E+05	
<b>73J</b>	<i>Morelia viridis</i>	Februar 2019	Maultupfer	positiv	33,5	5,6E+04	
<b>74K</b>	<i>Acrantophis dumerili</i>	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar			unauffällig
<b>75K</b>	<i>Acrantophis dumerili</i>	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>76L</b>	<i>Morelia spilota</i>	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar			unauffällig
<b>77L</b>	<i>Morelia spilota</i>	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>78L</b>	<i>Morelia spilota</i>	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar			
<b>79L</b>	<i>Morelia spilota</i>	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar			

<b>80L</b>	Python reticulatus	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar	
<b>81L</b>	Python reticulatus	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar	
<b>82M</b>	Python regius	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar	unauffällig
<b>83M</b>	Python regius	Juli 2018	Maultupfer	nicht detektierbar	

#### 4. Diskussion

Pneumonien, sowie Entzündungen der oberen Atemwege, sind ein relativ häufiges Problem bei Pythons in Gefangenschaft (Gál 2009, Blahak et al. 2020, Mustafa et al. 2020). Virale Erreger sind, neben bakteriellen Infektionen, wichtige Ursachen für diese Krankheitssymptome. Verschiedene RNA-Viren, wie Paramyxoviren (Ferlaviren), Reoviren und Arenaviren können diesen Symptomkomplex verursachen (Ariel 2011, Marschang 2011). Andere Ursachen für proliferative Pneumonien sind Chlamydiophilosis, Mycoplasmosen, chronische bakterielle oder parasitäre Infektionen und Toxinbelastung (Penner et al. 1997, Bodetti et al. 2002). Bodetti et al. (2002) berichten, dass Stämme von *Chlamydia pneumoniae* in der Umwelt weit verbreitet sind und in einer Reihe von Reptilien (Schlangen, Leguane, Chamäleons, Schildkröten) nachgewiesen werden konnten. Penner et al. (1997) isolierten eine neue Mycoplasmenart aus den Atemwegen bei einem Dunklen Tigerpython (*Python molurus bivittatus*) mit einer proliferativen, lymphozytären Tracheitis und Lungenentzündung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine diagnostische reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) entwickelt, die fortan am Institut der Virologie an der Vetmeduni Vienna als diagnostische Dienstleistung angeboten wird. Während die Primer der RT-qPCR von Blahak et al. (2020) auf das offene Leseraster 1B (ORF1B) ausgerichtet sind, ist die Zielsequenz der in dieser Studie neu designten Primer der ORF5, der für ein hochkonserviertes Nukleoprotein (N-Protein) des SNV kodiert. Durch die hohe Konservierung eignet es sich daher bestens als Detektionspunkt für den Nachweis von SNV. Die RT-qPCR ist dabei eine sehr sensitive Methode, bei der bereits geringste Virusausscheidungen zu einem positiven Ergebnis führen. Im Reaktionsansatz der Plasmid Verdünnungsreihe konnten bei 30,8 resp. 30,1 Zyklen noch 1000 Genomäquivalente zuverlässig nachgewiesen werden.

Bei der hier vorgestellten Verdünnungsreihe liegt der  $R^2$ -Wert bei 0,997. Ein  $R^2$ -Wert von über 0,99 beschreibt eine zuverlässige Korrelation zweier Werte. Die Steigung der Standardkurve beschreibt die Effizienz der RT-qPCR und liegt bei der in dieser Studie vorgestellten RT-qPCR bei -3,469. Die Effizienz liegt bei 94,2%. Idealerweise sollte die Effizienz einer PCR zwischen 90-100% liegen. Wenn die Effizienz 100% beträgt, liegen die CT-Werte der 10-fachen

Verdünnung genau 3,3 Zyklen auseinander. Das eigentliche Ziel dieser Arbeit, die Etablierung einer RT-qPCR, wurde erfüllt.

Zusätzlich zur Validierung der neuen RT-qPCR wurden 83 Schlangen unterschiedlicher Arten mittels der neuen RT-qPCR untersucht, wobei die große Mehrheit (52 Tiere) davon Grüne Baumpythons (*Morelia viridis*) waren. Um die PCR-Ergebnisse eventuell in Zusammenhang mit typischen respiratorischen Symptomen bringen zu können, wurden alle Schlangen klinisch untersucht. Alle 4 Baumpython-Bestände (A, F, I, J) mit vorberichtlichen Krankheitssymptomen wie erhöhter Schleimsekretion, Atemgeräuschen, Dyspnoe, Anorexie oder Stomatitis, wurden positiv auf Nidoviren getestet. Darunter waren 8/8 Tiere aus dem Bestand A, 4/4 Tiere aus dem Bestand F, 10/11 Tiere aus dem Bestand I und 7/9 Tiere aus dem Bestand J positiv. In den restlichen 3 Baumpython-Beständen (C, D und H) ohne vorberichtliche Auffälligkeiten, konnte ebenso mindestens ein Tier positiv auf Nidoviren getestet werden. Hier wurden 1/6 Tiere im Bestand C, 1/2 Tiere im Bestand D und 3/9 Tiere im Bestand H positiv getestet. Insgesamt wurden somit alle 7 Baumpython-Bestände positiv auf SNV getestet. Der Bestand B, bestehend aus 18 Schlangen (8 verschiedene Arten), wurde nicht zu den Baumpython-Beständen gezählt. In diesem Bestand wurden 3 Grüne Baumpythons negativ auf SNV getestet. Grundsätzlich kann man also sagen, dass der Zusammenhang zwischen typischen klinischen Symptomen einer SNV-Infektion und einem positiven PCR-Nachweis des Virus nicht immer gegeben ist. Allerdings zeichnet sich in dieser Arbeit durchaus ein Trend ab, dass Tiere, die eine respiratorische Symptomatik zeigen, oft tatsächlich SNV-positiv sind. 4/5 Beständen mit klinisch auffälligen Tieren wurden positiv auf SNV getestet. Somit sollte im Rahmen einer klinischen Untersuchung von Schlangen mit respiratorischen Problemen immer SNV als Differentialdiagnose in Betracht gezogen werden, da dieses Virus doch relativ weit verbreitet zu sein scheint. Hingegen schließen asymptomatische Tiere ein positives Ergebnis in der PCR nicht aus, was die Kontrolle des Virus innerhalb eines Bestands natürlich erschweren kann und daher grundsätzlich nur mit regelmäßigen PCR-Tests durchgeführt werden kann, um asymptomatische SNV-Träger zu identifizieren.

Die Tiere der Population A wurden von einem kommerziellen Labor (LABOKLIN GmbH & Co) negativ auf Arena-, Adeno-, Reo- und Paramyxovirus getestet. Eine virale oder bakterielle

Koinfektion der untersuchten Tiere kann allerdings nicht endgültig ausgeschlossen werden, da die Tiere nur einmalig auf die oben genannten Viren untersucht und keine bakteriologischen Untersuchungen durchgeführt wurden. Zusätzliche Faktoren wie Stress durch suboptimale Haltungsbedingungen oder Handling könnten die Virusausscheidung begünstigt haben. Auch die Probenentnahme und der Versand spielt eine entscheidende Rolle beim Nachweis von viralen Erregern. Trotz medizinischem Spezialtransport und anschließender Lagerung der zu untersuchenden Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$ , ist es möglich, dass die Probenqualität beeinträchtigt wurde.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten erstmals darauf hin, dass neben Maultupfern bei lebendigen und Organproben bei verstorbenen Tieren, auch Kotproben für die Durchführung einer SNV-spezifischen RT-qPCR in Betracht gezogen werden können. Diese würden sich besonders für ein regelmäßiges und einfaches Screening einzelner Bestände mittels Sammelkotproben eignen. Obwohl in dieser Arbeit hohe Viruslasten mit bis zu  $10^5$  GE/ $\mu\text{l}$  RNA im Kot nachgewiesen werden konnten (7Ab, 7Af und 8Ac), gibt es derzeit keinen Hinweis dafür, dass sich das Virus im Gastrointestinaltrakt (GIT) vermehrt. Pathohistologische Untersuchungen zeigten keine Veränderung im Bereich des Verdauungstraktes von Nidovirus infizierten Baumpythons (Blahak et al. 2020). Vielmehr handelt es sich beim GIT um einen Durchgangsort für das Virus, das mit dem Speichel abgeschluckt und über den Kot wieder ausgeschieden wird. Blahak et al. (2020) konnten bei ihren Untersuchungen an verstorbenen Schlangen die höchste Viruslast im Lungengewebe nachweisen. Das Virus konnte außerdem auch in Leber, Darm, Nieren und Hirn nachgewiesen werden (Blahak et al. 2020).

Die höchste Viruslast konnte bei einer klinisch gesunden Regenbogenboa (*Epicrates cenchria*) (23B) mit  $10^7$  GE/ $\mu\text{l}$  RNA nachgewiesen werden. Im Februar 2019 wurden Serum- und Plasmaproben untersucht, die alle negativ waren. Von diesen 8 Tieren konnten im Februar allerdings 5 Tiere über Maultupfer oder Kot positiv auf Nidovirus getestet werden. Diese Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass Serum- und Plasmaproben keine geeigneten Probenmaterialien für den Nachweis von Nidoviren zu sein scheinen.

Interessanterweise war der Virusnachweis der Kotproben und der Maultupfer im Februar 2019 nicht konstant. Bei der Mehrzahl der Tiere war entweder der Maultupfer oder die Kotprobe positiv, aber nie beides. Dies könnte einerseits mit der Probennahme, -lagerung und weiteren Verarbeitung zu tun haben oder auch mit dem generell höheren Ct-Wert und damit niedrigerer

Viruslast im Februar, verglichen mit dem Monat April des Vorjahres. Im Juni 2019, dem letzten Beprobungszeitpunkt des Bestandes A, waren alle Tiere positiv und zwar sowohl die Maultupfer, wie auch die Kotproben. Hier wurden, verglichen mit Februar, durchwegs höhere Viruslasten nachgewiesen und bis auf ein Tier (1A) konnten bei allen anderen Tieren typische klinische Symptome beobachtet werden. Daraus lässt sich eine Empfehlung ableiten, dass sowohl Tupfer als auch Kotproben zeitgleich untersucht werden können, um möglichst viele SNV-Träger identifizieren zu können.

Aufgrund der klinischen Relevanz von Nidoviren, sowohl für einzelne Tiere als auch für ganze Bestände, kann eine Beprobung als Routinediagnostik für viele Züchter von großer Bedeutung sein. Praktizierende Tierärzte sollten bei vorstelligen Schlangenpatienten mit respiratorischen Symptomen ein gezieltes Augenmerk auf Nidoviren legen. Es gibt Hinweise auf eine latente Form der Infektion bei der die Tiere nicht obligat erkranken (Blahak et al. 2020, Hoon-Hanks et al. 2020). Diese Tiere sind somit klinisch unauffällig, tragen aber als latente Träger möglicherweise zum Infektionsgeschehen im Zuchtbestand bei und könnten nur mittels molekularbiologischer Methoden identifiziert werden. Die unterschiedlichen Verlaufsformen scheinen dabei von latenten bis hin zu perakuten Erkrankungen, die in vielen Fällen tödlich enden können, zu variieren. Im Rahmen unserer Untersuchungen kann diese Annahme unterstützt werden: Während 2 klinisch auffällige Tiere (41F, 42F) verstorben sind, konnten 7 klinisch unauffällige Tiere (1A, 23B, 30C, 33D, 45H, 48H und 50H) positiv auf SNV getestet werden.

Ähnliche Verlaufsformen sind bereits seit langer Zeit bei mit Herpesvirus infizierten Landschildkröten beschrieben (Gerald et al. 1984). Zudem zeigen die wiederholten Untersuchungen der Population A in dieser Studie, dass die Virusausscheidung nicht konstant ist. Idealerweise sollten Stichprobentests wiederholt werden, um Tiere zu identifizieren, die das Virus nicht kontinuierlich ausscheiden. Einzelne negative Testergebnisse müssen daher mit Vorsicht interpretiert werden und eine weitere Untersuchung, bei respiratorischer Symptomatik, im Abstand von mehreren Wochen empfohlen werden. Erkrankte Tiere können dabei symptomatisch behandelt werden. Blahak et al. 2020 beschreiben eine Behandlung der Pneumonien durch eine sekundäre bakterielle Infektion mit Antibiotika (nach einer

Resistenzbestimmung via Antibiogramm) sowie unterstützender Flüssigkeitstherapie und der Gabe von nichtsteroidalen Antiphlogistika. Trotz des Therapieversuchs sind insgesamt 20 von 60 Tieren verstorben (Blahak et al. 2020). Somit kann diese Erkrankung einen erheblichen wirtschaftlichen Verlust für den Züchter darstellen und ist, neben der Tiergesundheit an sich, ein weiteres Argument für ein regelmäßiges Screening der Bestände.

Die Identifizierung von SNV-positiven Tieren, die keine klinischen Anzeichen einer Erkrankung zeigen, spielt eine entscheidende Rolle für das notwendige Management von Tierbeständen und Tierzuchten. Ein besonderes Augenmerk sollte dabei auf Tiere gelegt werden, bei denen die RT-qPCR auf eine hohe Viruslast hinweist. Tiere mit einer besonders hohen Virusausscheidung stellen eine potentiell höhere Gefahr für die Infektion weiterer Tiere im Bestand dar. Ein direkter Zusammenhang zwischen dem Nachweis von SNV über eine RT-qPCR und den klinischen Symptomen, konnte im Rahmen dieser Arbeit, sowie in vorgegangenen Studien nicht bestätigt werden (Blahak et al. 2020).

Es ist davon auszugehen, dass sich das Virus primär über Sekrete überträgt. Entsprechende Hygienemaßnahmen können helfen, die Übertragung innerhalb des Bestandes zu minimieren. Terrarien, Einrichtungsgegenstände, Handschuhe und Futterpinzetten sollten zwischen dem Kontakt unterschiedlicher Tiere desinfiziert werden. Angebissene oder regurgitierte Futtertiere sollten keinesfalls an andere Tiere im Bestand verfüttert werden. Eine strikte Isolierung von viruspositiven aber asymptomatischen Tieren unter Einhaltung einer verantwortungsvollen Hygiene ist notwendig um die Ausbreitung innerhalb des Bestandes so gering wie möglich zu halten.

Ankaufsuntersuchungen von klinisch unauffälligen Tieren, sowie Quarantäneverfahren bei Neuzugängen und systematische Tests aller Tiere in einer privaten oder zoologisch geführten Haltung, können dazu beitragen, wertvolle Bestände zu schützen und die Ausbreitung dieser potenziell tödlichen Infektion zu minimieren.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Studie wurde eine reverse Transkriptase quantitative PCR (RT-qPCR) etabliert und validiert, die für das hochkonservierte Nukleoprotein (N-Protein) kodiert und eine Infektion mit Nidovirus bei Schlangen nachweisen kann.

Erkrankte Tiere können Symptome wie Pharyngitis, Tracheitis, erhöhte Schleimproduktion im Maul, Stomatitis und Dyspnoe zeigen. Die Ergebnisse der quantitativen RT-PCR zeigten eine Infektion mit Nidovirus in 8 von 13 Beständen in Österreich und Luxemburg. Insgesamt wurden dazu 128 diagnostische Proben ausgewertet, bei denen 35/83 Schlangen (42,2%) positiv auf das Nidovirus getestet wurden, darunter 34/71 (47,89 %) Pythons und 1/12 (8,33%) Boas.

Die höchste Viruslast konnte über einen Maultupfer bei einer klinisch gesunden Regenbogenboa (*Epicrates cenchria*) mit  $10^7$  GE/ $\mu$ l RNA nachgewiesen werden. Hohe Virusmengen von bis zu  $10^5$  GE/ $\mu$ l RNA konnten in Kotproben von Grünen Baumpythons nachgewiesen werden. Serum- und Plasmaproben hingegen sind keine geeigneten Probenmaterialien für den Nachweis von Nidoviren.

Über den Zeitraum der Untersuchungen (April 2018 bis Juni 2019) war der Virusnachweis bei 3/8 Tieren nicht konstant. Während 2 klinisch auffällige Tiere über den Zeitraum der Untersuchungen verstorben sind, konnten 7 klinisch unauffällige Tiere positiv auf SNV getestet werden. Die unterschiedlichen Verlaufsformen variieren von latenten bis hin zu perakuten Erkrankungen.

Die in dieser Studie vorgestellte RT-qPCR ist ein nützliches, nicht-invasives Verfahren, das ein diagnostisches Hilfsmittel zum Nachweis einer Infektion mit Nidoviren bei lebenden Schlangen bietet. Als Probenmaterial eignen sich Maultupfer auf der Höhe der Glottis. Außerdem konnte eine hohe Viruslast in Kotproben nachgewiesen werden. Kloakaltupfer, sowie Plasma- und Serumproben scheinen als Probenmaterial weniger verlässlich zu sein. Stichprobentests sollten

in Abständen von mehreren Wochen wiederholt werden, um Tiere zu identifizieren, die das Virus nicht kontinuierlich ausscheiden.

## 6. Summary

In this study, a quantitative real-time PCR (RT-qPCR) encoding the highly conserved nucleoprotein was established and validated to detect nidovirus infection in snakes.

Infected animals may show symptoms such as pharyngitis, tracheitis, increased oral mucus production, stomatitis and dyspnea. The results of the quantitative real-time PCR showed an infection with nidovirus in 8 of 13 snake collections. A total of 128 diagnostic samples from 13 different snake collections in Austria and Luxemburg were analysed, in which 35/83 snakes (42.2%) were tested positive for nidovirus, including 34/71 (47.89%) pythons and 1/12 (8.33%) boas.

The highest level of virus was detected via oral swab in a clinically healthy rainbow boa (*Epicrates cenchria*) with  $10^7$  GE/ $\mu$ l RNA. High virus levels with up to  $10^5$  GE/ $\mu$ l RNA were detected in fecal samples of green tree python. Serum and plasma samples, on the contrary, are not suitable sample materials for the detection of nidoviruses.

Over the period of study (April 2018 to June 2019), virus detection was not constant in 3/8 animals. While 2 animals with symptoms died over the period of study, 7 clinically healthy appearing animals were tested positive for SNV. The different clinical presentations varied from latent to peracute disease.

The RT-qPCR presented in this study is a useful, non-invasive method that provides a diagnostic tool to identify nidovirus infection in live snakes. Oral swabs taken at the level of the glottis proved to be reliable sample materials. A high virus load was also detected in fecal samples. Cloacal swabs as well as plasma and serum samples seemed to be less reliable as sample material. Random testing should be repeated at intervals of several weeks to identify intermittent shedders.

## 7. Literaturverzeichnis

- Ariel E. 2011. Viruses in reptiles. *Veterinary Research*, 42(1):1–12.
- Barker DG, Barker TM. 1994. *Pythons of the World*, Vol. 1. Australia. Lakeside, CA: Advanced Vivarium Systems Inc.
- Blahak S, Jenckel M, Höper D, Beer M, Hoffmann B, Schlottau K. 2020. Investigations into the presence of nidoviruses in pythons. *Virology Journal*, 17(1):6.
- Bodetti TJ, Jacobson E, Wan C, Hafner L, Pospischil A, Rose K, Timms P. 2002. Molecular evidence to support the expansion of the hostrange of *Chlamydomphila pneumoniae* to include reptiles as well as humans, horses, koalas and amphibians. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(1):146–152.
- Bodewes R, Kik MJL, Stalin Raj V, Schapendonk CME, Haagmans BL, Smits SL, Osterhaus ADME. 2013. Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *Journal of General Virology*, 94(6):1206–1210.
- Bodewes R, Lempp C, Schürch AC, Habierski A, Hahn K, Lamers M, Von Dörnberg K, Wohlsein P, Drexler JF, Haagmans BL, et al. 2014. Novel divergent nidovirus in a python with pneumonia. *Journal of General Virology*, 95(11):2480–2485.
- Britton P, Cavanagh D. Nidovirus genome organization and expression mechanisms. 2014. In: Perlman S, Gallagher T, Snijder EJ, Hrsg. *Nidoviruses*. Washington, DC: ASM Press, 29-46.
- Chitty J. 2004. Respiratory system. In: Simon J. Girling, Raiti P, Hrsg. *Manual of Reptiles*. 2nd ed. Quedgeley: BSAVA, 230-242.
- Dervas E, Hepojoki J, Laimbacher A, Romero-Palomo F, Jelinek C, Keller S, Smura T, Hepojoki S, Kipar A, Hetzel U. 2017. Nidovirus-Associated Proliferative Pneumonia in the Green Tree Python (*Morelia viridis*). *Journal of Virology*, 91(21).
- Enjuanes L, Gorbalenya AE, de Groot RJ, Cowley JA, Ziebuhr J, Snijder EJ. 2008. Nidovirales. In: Mahy BWJ, Van Regenmortel M, Walker P, Majumder-Russell D, Hrsg. *Encyclopedia of Virology*. 3rd ed. Oxford: Elsevier Ltd, 419-430.
- Ferron F, Debat HJ, Decroly E, Canard B. 2019. Identification of a Nidovirales Orf1a N7-guanine cap Methyltransferase signature-sequence as a genetic marker of large genome Tobaniviridae. *bioRxiv*, 639369.

- Forman MS, Valsamakis A. 2011. Specimen collection, transport and processing: Virology. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, Hrsg. Manual of Clinical Microbiology. 10th Ed. Washington, DC: ASM Press, 1276-1288.
- Gál J. 2009. Stomatitis of arboreal snakes and its treatment. Literature review. Magyar Állatorvosok Lapja, 131(10):620–623.
- Hoff GL, Hoff DM. 1984. Herpesviruses of reptiles. In: Hoff GL, Frye FL, ER Jacobson, Hrsg. Diseases of Amphibians and Reptiles. New York: Plenum Press, 159-167.
- Gorbalenya AE, Enjuanes L, Ziebuhr J, Snijder EJ. 2006. Nidovirales: Evolving the largest RNA virus genome. Virus Research, 117(1):17–37.
- Gravendyck M, Ammermann P, Marschang RE, Kaleta EF. 1998. Paramyxoviral and reoviral infections of iguanas on Honduran Islands. Journal of Wildlife Diseases, 34(1):33–38.
- Hetzl U, Sironen T, Laurinmaki P, Liljeroos L, Patjas A, Henttonen H, Vaheri A, Artelt A, Kipar A, Butcher SJ, et al. 2013. Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. Journal of Virology, 87(20):10918–10935.
- Hoon-Hanks LL, Layton ML, Ossiboff RJ, Parker JSL, Dubovi EJ, Stenglein MD. 2018. Respiratory disease in ball pythons (*Python regius*) experimentally infected with ball python nidovirus. Virology, 517:77–87.
- Hoon-Hanks LL, Stöhr AC, Anderson AJ, Evans DE, Nevarez JG, Díaz RE, Rodgers CP, Cross ST, Steiner HR, Parker RR, et al. 2020. Serpentovirus (Nidovirus) and Orthoreovirus Coinfection in Captive Veiled Chameleons (*Chamaeleo calytratus*) with Respiratory Disease. Viruses, 12(11):1329.
- Hyndman TH, Marschang RE, Wellehan JFX, Nicholls PK. 2012. Isolation and molecular identification of Sunshine virus, a novel paramyxovirus found in Australian snakes. Infection, Genetics and Evolution, 12(7):1436–1446.
- Marschang RE. 2011. Viruses Infecting Reptiles. Viruses, 3(11):2087–2126.
- Marschang RE, Kolesnik E. 2017. Nachweis von Nidoviren bei lebenden Pythons und Boas. Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere Heimtiere, 45(01):22–26.
- Maxwell G. 2005. *Morelia viridis*: Das Kompendium. Frankfurt am Main: Chimaira.
- Mustafa S, Zlateva-Panayotova N, Marinov G. 2020. Tracheal lavage - a method of sampling the lower respiratory tract in snakes. Tradition and modernity in Veterinary Medicine,

- 5(1(8)):110–113.
- Natusch DJD, Lyons JA. 2012. Relationships between ontogenetic changes in prey selection, head shape, sexual maturity, and colour in an Australasian python (*Morelia viridis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 107(2):269–276.
- Nga PT, Parquet M del C, Lauber C, Parida M, Nabeshima T, Yu F, Thuy NT, Inoue S, Ito T, Okamoto K, et al. 2011. Discovery of the First Insect Nidovirus, a Missing Evolutionary Link in the Emergence of the Largest RNA Virus Genomes. *PLoS Pathogens*, 7:e1002215.
- O’Dea MA, Jackson B, Jackson C, Xavier P, Warren K. 2016. Discovery and partial genomic characterisation of a novel nidovirus associated with respiratory disease in wild shingleback lizards (*Tiliqua rugosa*). *PLoS ONE*, 11:e0165209.
- Pasternak AO, Spaan WJM, Snijder EJ. 2006. Nidovirus transcription: How to make sense...? *Journal of General Virology*, 87(6):1403–1421.
- Penner JD, Jacobson ER, Brown DR, Adams HP, Besch-Williford CL. 1997. A novel *Mycoplasma* sp. associated with proliferative tracheitis and pneumonia in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*). *Journal of Comparative Pathology*, 117(3):283–288.
- Stenglein MD, Sanders C, Kistler AL, Graham Ruby J, Franco JY, Reavill DR, Dunker F, DeRisio JL. 2012. Identification, characterization, and in vitro culture of highly divergent arenaviruses from boa constrictors and annulated tree boas: Candidate etiological agents for snake inclusion body disease. *mBio*, 3:e00180-12.
- Stenglein MD, Jacobson ER, Wozniak EJ, Wellehan JFX, Kincaid A, Gordon M, Porter BF, Baumgartner W, Stahl S, Kelley K, et al. 2014. Ball python nidovirus: A candidate etiologic agent for severe respiratory disease in *Python regius*. *mBio*, 5:e01484-14.
- Uccellini L, Ossiboff RJ, De Matos RE, Morrissey JK, Petrosov A, Navarrete-Macias I, Jain K, Hicks AL, Buckles EL, Tokarz R, et al. 2014. Identification of a novel nidovirus in an outbreak of fatal respiratory disease in ball pythons (*Python regius*). *Virology Journal*, 11:144.
- Zhang J, Finlaison DS, Frost MJ, Gestier S, Gu X, Hall J, Jenkins C, Parrish K, Read AJ, Srivastava M, et al. 2018. Identification of a novel nidovirus as a potential cause of large scale mortalities in the endangered Bellinger River snapping turtle (*Myuchelys georgesi*). *PLoS ONE*, 13(10):e0205209.

## 8. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Grüner Baumpython ( <i>Morelia viridis</i> ) aus der Lokalform „Sorong“. Rot gefärbtes Jungtier. Foto: Jeff Schreiner, Dezember 2014 .....	4
<b>Abbildung 2:</b> Grüner Baumpython ( <i>Morelia viridis</i> ) aus der Lokalform „Sorong“. Es handelt sich hierbei um das gleiche Individuum wie bei <b>Abb. 1</b> . Foto: Jeff Schreiner, Februar 2016...	5
<b>Abbildung 3:</b> Phylogenetischer Baum, der die genetischen Beziehungen der Mitglieder der Unterfamilie Torovirinae auf der Grundlage der konservierten RdRp-Stelle des Polyproteins 1b zeigt. (Zhang et al. 2018).....	8
<b>Abbildung 4:</b> Juveniler Grüner Baumpython ( <i>Morelia viridis</i> ) aus der Lokalform „Sorong“ mit einer hochgradigen rezidivierenden Stomatitis. Dieses Tier wurde im Rahmen dieser Arbeit positiv auf Nidovirus getestet. Foto: Jeff Schreiner, Oktober 2018 .....	11
<b>Abbildung 5:</b> Vereinfachte schematische Darstellung der unterschiedlichen Morphologie verschiedener Vertreter aus der Ordnung der Nidovirales. (ICTV Ninth Report; 2009 Taxonomy Release de Groot et al.) .....	12
<b>Abbildung 6:</b> Genomorganisation einzelner Nidoviren mit Bezeichnung der einzelnen Genomabschnitte (Enjuanes et al. 2008). .....	13
<b>Abbildung 7:</b> Schematische Darstellung eines pGEM-T Vektors zur Klonierung von PCR-Produkten der Firma Promega.....	25
<b>Abbildung 8:</b> OneTaq One Step RT-PCR auf das N-Gen des SNV mit Primer NVNforw28644 und NVNrev29079 auf das RNA Extrakt, das Produkt der PCR weist eine Bande bei ca. 500 bp auf. (M) Marker, (1) Einzelprobe bei 50 °C Annealing, (2) Poolprobe bei 50 °C Annealing, (3) Einzelprobe bei 55 °C Annealing, (4) Poolprobe bei 55 °C Annealing. ....	32
<b>Abbildung 9:</b> Test-Verdau der Klone des Plasmids pL592#1 - #6 mit EcoRI. Bei allen 6 Klonen ist das Insert mit 500 bp und der T-Vektor mit 3000 bp zu sehen. (M) Marker, (1) pL592#1, (2) pL592#2, (3) pL592#3, (4) pL592#4, (5) pL592#5, (6) pL592#6. ....	32
<b>Abbildung 10:</b> Test-Verdau der Midipräparation von pL592#9 mit EcoRI (M) Marker, (1) pL592#6.....	33
<b>Abbildung 11:</b> Verdünnungsreihe des Standards – Die 7 Kurven zeigen die Amplifikate der Verdünnungsreihe $10^{-2}$ bis $10^{-8}$ , die entsprechend ihrer Ausgangs-DNA-Konzentration im	

Amplifikationsplot bei unterschiedlichen Zyklen ansteigen. Die Verdünnungsreihe wurde dabei als Duplikat mit dem Rotor-Gene Q <sup>®</sup> (Qiagen, Hilden, Deutschland) angefertigt. ....	34
<b>Abbildung 12:</b> Die RT-qPCR Standard Kurve der Verdünnungsreihe ergibt einem R <sup>2</sup> -Wert von 0,997 und eine Steigung von -3,469. Die Effizienz beträgt 94,2%. ....	35
<b>Abbildung 13:</b> Die Standardkurve der RT-qPCR Proben die auf das Schlangen-Nidovirus getestet wurden. Die Proben wurden mit dem Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Thermocycler (Applied Biosystems, Foster City, USA) quantifiziert. ....	36

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> RNA-Viren bei Reptilien.....	7
<b>Tabelle 2:</b> Die 13 unterschiedlichen Bestände wurden mit den Buchstaben A-M kodiert. Eine jeweilige Tier-ID kennzeichnet jedes einzelne Tier mit einer individuellen Nummer und dem Buchstaben des Bestandes. Insgesamt wurden 83 Schlangen getestet.....	18
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Primer und Sonde die das N-Protein kodieren.....	21
<b>Tabelle 4:</b> Verdünnungsreihe des Standards. Das Plasmid pL592#6 wurde in einer Verdünnungsreihe von $10^{-2}$ bis $10^{-9}$ als Duplikat angefertigt.....	34
<b>Tabelle 5:</b> Insgesamt wurden 128 Proben von 83 unterschiedlichen Schlangen untersucht und mit Hilfe einer quantitativen Echtzeit RT-PCR auf Nidovirus getestet. ....	40

## 10. Danksagung

Nachdem die Abgabe dieser Arbeit meinen baldigen Studienabschluss bedeutet, möchte ich die Gelegenheit nutzen mich bei einigen Menschen zu bedanken, die mich über den Zeitraum meiner Ausbildung zum Tiermediziner unterstützt haben. An erster Stelle möchte ich meine Familie nennen, die mich über diese sieben Jahre stets begleitet hat. Besonders meine Eltern haben mir geholfen mein Studium in Österreich und meine zahlreichen Praktika rund um die Welt zu ermöglichen. Während meiner monatelangen Auslandsaufenthalte haben sie eine erhebliche Anzahl exotischer Tiere betreut und ich habe ihnen zu verdanken, dass ich diese wertvollen und seltenen Tiere weiterhin zu meinem Bestand zählen kann. Ein besonderer Dank geht dabei an meiner Mutter Diane Schreiner und meinen Vater Eduard Schreiner.

Nicht außer Acht zu lassen ist mein Dank an die Mitarbeiter des Instituts der Virologie. Namentlich möchte ich vor allem Dr.<sup>in</sup> med.vet Kerstin Seitz, Prof. Dr. Benjamin Lamp und zu guter Letzt Prof. Dr.med.vet. Till Rümenapf hervorheben. Es ist nicht selbstverständlich an einer Universitätsabteilung auf eine solch offene und positive Art betreut zu werden.

Ich möchte mich besonders bei Dr. Jean Meyer bedanken, der wichtige Proben zur Verfügung gestellt hat und einen wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Ohne die Züchter und die zoologischen Einrichtungen, die mich stets mit offenen Armen empfangen haben, wäre diese Arbeit natürlich nicht möglich gewesen.

Der Erfolg einer einzelnen Person ist nicht nur auf das eigene Engagement zurückzuführen. Oftmals stehen unfassbar tolle Menschen hinter einem, die einen während der Zeit des Studiums begleiten und unterstützen. Es ist die Leidenschaft, angefacht von unglaublichen Erlebnissen und besonderen Begegnungen mit inspirierenden Menschen, die mich auf den Weg geführt haben, den ich nun einschlagen werde. Schließlich sind es die kleinen Momente im Leben, die einen prägen.