

Aus dem Department für Pathobiologie der
Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Mikrobiologie
(Leiterin: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. rer. nat. Monika Ehling-Schulz)

**Mikrobiologisch-diagnostische Aufarbeitung von Proben aus
einer Giftschlangenhaltung mit vorangegangenen Chlamydien-
assoziierten Erkrankungsfällen**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von
Philipp Ricardo Figueroa

Wien, März 2021

Betreuer:

Priv.-Doz. Dr. med. vet. Joachim Spergser Dipl. ECVM

Department für Pathobiologie

Institut für Mikrobiologie

Veterinärplatz 1, 1210 Wien Österreich

Joachim.Spergser@vetmeduni.ac.at

Dr. Jean Meyer, Fachtierarzt für Kleintiere

Tierarztpraxis Völkendorf

Paulapromenade 20

9500 Villach

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich zunächst herzlichst bei meinen beiden Betreuern Priv.-Doz. Dr. med. vet. Joachim Spergser Dipl. ECVM und Dr. Jean Meyer, für die stets wunderbare Zusammenarbeit sowie Unterstützung bedanken, die diese Diplomarbeit überhaupt erst möglich gemacht haben. Spezieller Dank geht nochmals an Dr. Jean Meyer, der mir die Proben für diese Arbeit zukommen ließ.

Besonderer Dank geht außerdem an Herrn Michael Steinbrecher, der mich bei der Aufarbeitung der Proben nie im Stich ließ, mich bei der Laborarbeit stets mit einer helfenden Hand unterstützte und bei keiner meiner vielen Fragen jemals das Handtuch warf.

Weiterer Dank geht an meine Verlobte Susanne Koroschetz, die während der Erstellung dieser Arbeit immer an meiner Seite war und mich immer unterstützte, egal wie stressig und mühsam der Tag auch war.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	desoxyribonucleic acid
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
ITS	Internal-Transcribed-Spacer
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
l	Liter
m	Meter
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time Of Flight
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
MS	Massenspektrometrie
MSP	Main Spectrum Profile
n	Anzahl
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
sek	Sekunde
sp.	species
spp.	species pluralis
ssp.	subspecies
V	Volt
Ch	Choane
Kl	Kloake
Terra	Terrarium
M	Männlich
W	Weiblich
WF	Wildfang
NZ	Nachzucht
Wo	Woche
AB	Aufzuchtbecken
Fr	Freiland

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Literatur	2
2.1 Bakterielle Infektionserreger	2
2.1.1 Chlamydien	3
2.1.2 Salmonellen	4
2.1.3 Mykoplasmen	5
2.1.4 Mykobakterien	6
2.2 Pilzliche Infektionserreger	7
2.3 Virale Infektionserreger	9
2.4 Parasitäre Infektionserreger	11
3. Material und Methoden	13
3.1 Vorbereitungen für die Probennahme	13
3.2 Choanen – und Kloakentupfer	13
3.4 Kultivierung	19
3.4.1 Bakterien	19
3.4.2 Pilze	19
3.4.3 Mykoplasmen	20
3.5. MALDI-TOF Massenspektrometrie	21
3.6 PCR	22
3.6.1 DNA-Extraktion	22
3.6.2 PCR	24
3.6.3 Gelelektrophorese	30
3.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte	30
4. Ergebnisse	31
4.1 Bakterien und Pilze	31
4.1.1 Salmonellen	37
4.1.2. Chlamydien	39
4.1.3 Mykobakterien	39
4.1.4 Mykoplasmen	40
5. Diskussion	41

6. Zusammenfassung	47
7. Summary	49
8. Literaturverzeichnis	51
8. Tabellenverzeichnis	72

1. Einleitung

Um einen Überblick über die Vorkommenshäufigkeit von respiratorischen Infektionserregern in einem Giftschlangenbestand mit Chlamydien-assoziierten Erkrankungsfällen zu erhalten, wurde auf Wunsch des Tierbesitzers ein umfassendes mikrobiologisches Screening des Bestandes durchgeführt und zu diesem Zweck Tupferproben durch den betreuenden Tierarzt genommen. Die Proben wurden anschließend am Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Universität Wien durch Einsatz von kulturellen und molekulargenetischen Nachweisverfahren auf bakterielle und pilzliche Erreger untersucht.

Für diese Arbeit wurden Schlangen aus der Familie der *Viperidae* beprobt. Die Familie der *Viperidae* umfasst insgesamt 39 Gattungen von Vipern und Ottern. Taxonomisch über ihr steht die Überfamilie der Nattern- und Vipernartigen (*Colubroidea*). Verbreitet sind ihre Vertreter in Amerika, Afrika und Eurasien. (Zaher et al. 2019)

Da Schlangen mittlerweile zu den sehr häufig in Privathaushalten gepflegten Exoten zählen, kam es auch in den letzten Jahren zu einer steten Weiterentwicklung dieses Fachbereichs der Veterinärmedizin (Driggers, 2000). Zu den häufigsten Erkrankungen bei Schlangen zählen infektiöse Atemwegserkrankungen, die durch verschiedenste Erreger wie Bakterien, Viren, Parasiten oder Pilze verursacht werden können, wobei sowohl der obere als auch der untere Atmungstrakt betroffen sein kann (Driggers, 2000). Gerade in großen Beständen, wie zum Beispiel in zoologischen Einrichtungen können diese Atemwegserkrankungen zu massiven Problemen und Tierverlusten führen, was es im konkreten Fall und auf Besitzerwunsch durch eine umfassende mikrobiologische Bestandsuntersuchung zu verhindern galt.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es daher, Chlamydien und weitere potenzielle respiratorische Infektionserreger in einer Giftschlangenhaltung mit kürzlich diagnostizierten Chlamydien-assoziierten Atemwegserkrankungen auf Bestandesebene nachzuweisen. Ein vorrangiges Ziel war dabei die Identifizierung von asymptomatischen Trägertieren, um infolge durch entsprechende Maßnahmen wie Quarantänisierung einzelner Individuen und Einhaltung von erstellten Hygienekonzepten eine weitere Erregerausbreitung im Bestand zu verhindern und dabei mögliche Infektketten zu durchbrechen.

2. Literatur

2.1 Bakterielle Infektionserreger

Die pharyngealen Mikrobiota von Schlangen umfassen ein breites Spektrum von sowohl aeroben als auch anaeroben Mikroorganismen und kann auch fäkale Keime, die üblicherweise durch Futtertiere ausgeschieden werden, vorweisen (Garg et al., 2009).

Gerade bei in menschlicher Obhut gehaltenen Reptilien sollten auch immer die Haltungsbedingungen bei der Bestimmung dieser Mikrobiota miteinbezogen werden, da zwar bakterielle Infektionen gelegentlich von primär pathogenen Erregern ausgelöst werden können, jedoch sehr häufig von opportunistischen Erregern. Diese sind bei Immunsuppression, ausgelöst durch inadäquate klimatische Haltungsbedingungen (Temperatur, Luftfeuchtigkeit) und mangelnde Terrarienhigiene, für einen Großteil der bakteriellen Infektionen verantwortlich (Chinnadurai und Devoe, 2009).

Aufgrund der Häufigkeit von Schlangenbissen und den damit einhergehenden sekundären Wundinfektionen bei Menschen, wurden bereits einige Studien über jene potenziellen Sekundärerreger durchgeführt, wie sie beispielsweise bei Bissen durch Vertreter der Gattung *Bothrops* (Jorge et al., 1994) auftreten können. In diesen Studien konnten aus dem Oropharynx einiger Schlangenarten und bei mehreren Individuen potenzielle Sekundärerreger wie *Providencia rettgeri*, *Staphylococcus aureus*, *Citrobacter* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* und *Morganella morganii* isoliert werden (Jorge et al., 1990; Goldstein et al., 1981; Brenes-Chacón et al., 2019). Viele dieser Erreger gelten als physiologische Komponente der oropharyngealen Mikrobiota von Schlangen (Draper et al., 1981; Martínéz et al., 2006). Unter bestimmten Umständen kann es aber dazu kommen, dass die als physiologisch angesehenen Bakterien schwere Erkrankungen auch bei Schlangen auslösen können. So konnte zum Beispiel in einem Fallbericht, bei dem ein heller Tigerpython (*Python molurus*) durch eine Septikämie verstorben ist, *Corynebacterium macginleyi* und *Stenotrophomonas maltophilia* als ursächliche Erreger identifiziert werden (Martínéz et al., 2006). In einem anderen Fallbericht aus China wurde eine letale, durch eine Infektion mit *Morganella morganii* hervorgerufene septische exsudative Pneumonie und Endokarditis bei einer Brillenschlange (*Naja naja*) beschrieben. (Wang et al., 2016).

2.1.1 Chlamydien

Bakterien innerhalb der Gattung *Chlamydia* sind biologisch einzigartige, obligat intrazelluläre Mikroorganismen, die sowohl bei Menschen als auch bei wildlebenden und domestizierten Säugetieren, Vögeln und Reptilien Erkrankungen verursachen können (Taylor-Brown et al., 2015). Chlamydien-assoziierte Krankheitsbilder können vielfältig sein und Spätaborte, Infertilität, Konjunktivitis sowie Pneumonien miteinschließen (Staub et al., 2018). Durch intensive taxonomische Forschung konnte das Phylum *Chlamydiae* in den letzten Jahren mit Vertretern der sogenannten „Chlamydien-ähnlichen-Organismen“ erweitert werden (Taylor-Brown et al., 2015). Zu diesen zählen u.a. die Vertreter der Gattungen *Parachlamydia* (Amman et al., 1997; Everett et al., 1999), *Neochlamydia* (Horn et al., 2000), *Protochlamydia* (Collingro et al., 2005), *Mesochlamydia* (Corsaro et al., 2013), *Metachlamydia* (Corsaro et al., 2013) und der Familien *Waddliaceae* (Rurangirwa et al., 1999; Chua et al., 2005), *Simkaniaceae* (Kahane et al., 1993; Thao et al., 2003; Everett et al., 2005; Fehr et al., 2013) und *Rhabdochlamydiaceae* (Kostanjsek et al., 2004; Corsaro et al., 2007). Die „Chlamydien-ähnlichen Organismen“ weisen wie Vertreter der Gattung *Chlamydia* einen obligat intrazellulären Lebenszyklus sowie einen vergleichbaren Entwicklungszyklus auf, haben aber ein breiteres Spektrum an morphologischen Eigenschaften, Wirtsspezifitäten und von ihnen ausgelösten Krankheitsbildern (Taylor-Brown et al., 2015).

Chlamydien-Infektionen können bei wildlebenden und in menschlicher Obhut gehaltenen Reptilien verschiedene Symptome und pathologische Veränderungen verursachen. Dazu zählen hochgradige granulomatöse Läsionen in der Lunge, Veränderungen des Lungenparenchyms (Soldati et al., 2004; Jacobson et al., 1989) sowie proliferative Pneumonien (Frutos et al., 2014; Jacobson et al., 2004). Auch andere Organsysteme können betroffen sein, so wurden auch nekrotisierende Enteritis und Myokarditis (Homer et al., 1994) sowie Hepatitis und Konjunktivitis bei Schlangen nach Chlamydien-Infektionen festgestellt (Huchzermeyer et al., 2008).

Obwohl *Chlamydia pneumoniae* ursprünglich ausschließlich als respiratorisches Pathogen in der Humanmedizin beschrieben wurde, gilt der Erreger auch als Verursacher von Chlamydiosen bei Reptilien, Koalas, Pferden und Amphibien (Bodetti et al., 2002). *Chlamydia pneumoniae* verursacht infektiöse Erkrankungen der oberen,- und unteren Atemwege beim

Menschen und beim Tier (Mitchell et al., 2010). Kürzlich durchgeführte Studien konnten aufzeigen, dass Schlangen mit einer Vielzahl an verschiedenen, bis dato nicht charakterisierten Chlamydien-Arten und auch „Chlamydien-ähnliche-Organismen“ besiedelt sein können (Soldati et al., 2004; Staub et al., 2018). Auch konnten neue Chlamydien-Arten wie *Chlamydia serpentis* sp. nov. und *Chlamydia poikilothermis* sp. nov. bei Schlangen beschrieben werden (Staub et al., 2018). Spezifische Krankheitsbilder, die diese beiden Spezies auslösen können, sind allerdings bislang unbekannt (Staub et al., 2018). Leider gestaltet sich die Beschreibung von neuen Chlamydien-Arten aufgrund der fehlenden Kultivierbarkeit auf zellfreien Nährmedien als schwierig (Staub et al., 2018).

2.1.2 Salmonellen

Salmonellen sind bedeutsame Infektionserreger bei Menschen und Tier (Selbitz et al., 1995; Turnbull, 1979; Geue et al., 2002). Salmonellen sind Gram-negative Bakterien, die zur Familie *Enterobacteriaceae* gehören. Salmonellen weisen eine hohe Tenazität auf und können über Wochen in trockener Umgebung und über Monate im Wasser überleben (Brenner et al., 2000). Die Gattung *Salmonella* besteht aus zwei Arten, nämlich *Salmonella enterica* und *Salmonella bongori* (Pulford et al., 2019). *Salmonella enterica* wird in sechs Unterarten unterteilt: *Salmonella enterica* ssp. *enterica* (I), *S. enterica* ssp. *salamae* (II), *S. enterica* ssp. *arizonae* (IIIa), *S. enterica* ssp. *diarizonae* (IIIb), *S. enterica* ssp. *houtenae* (IV) und *S. enterica* ssp. *indica* (VI) (Brenner et al., 2000). Diese Subspezies werden in rund 2600 unterschiedliche Serovare, die sowohl ökologische, phänotypische, als auch genetische Vielfalt aufweisen, unterteilt (Winfield und Groisman, 2004).

Zahlreiche Reptilienarten sind bekannt dafür, *Salmonella* als Teil ihrer autochtonen Darmmikrobiota zu beherbergen und diese dadurch intermittierend über den Kot auszuscheiden (Burnham et al., 1998; Madsen et al., 1998; Pedersen et al., 2009). Das Bakterium gilt in der Regel als physiologische Komponente der intestinalen Mikrobiota von Reptilien, was einige Studien mit einer Prävalenzrate von bis zu 90% der untersuchten Reptilien, mit einem breiten Spektrum an Serovaren belegen (Adesiyun et al., 1998; Geue et al., 2002; Chen et al., 2010; Scheelings et al., 2011). Somit stellen Reptilien sowohl ein bedeutsames Reservoir für *Salmonella* als auch ein signifikantes zoonotisches Risiko für Kontaktpersonen, wie

Tierbesitzer und Tierärzte dar (Pedersen et al., 2009; Mermin et al., 2004; Johnson-Delaney et al., 2006).

Generell sind Salmonellen bei Reptilien auf den Darmtrakt beschränkt, ohne Ausbreitung in extraintestinalen Organsysteme (Scheelings et al., 2011). Es kann allerdings unter gewissen Umständen wie bei auftretenden Stressfaktoren vorkommen, dass Salmonellen die Darmschleimhautbarriere durchbrechen und infolge systemische Erkrankungen verursachen können (Scheelings et al., 2011). Auch weitere Faktoren wie Handling, Transport, Überbesetzung von Terrarien oder falsche Haltungsbedingungen können eine systemische Salmonellose begünstigen (Scheelings et al., 2011). Obwohl sie im Allgemeinen als Kommensale des Magendarmtraktes gelten, können Salmonellen unter Umständen eine der Hauptursachen für das Versterben von Individuen in Reptilienbeständen sein. So konnte eine Studie in einer renommierten Wildtier-Auffangstation in Australien aufzeigen, dass *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae* fatale systemische Erkrankungen bei Reptilien hervorrufen können (Scheelings et al., 2011). Auch in einer europäischen Studie konnte eine hohe Prävalenz von *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae* bei in menschlicher Obhut gehaltenen Schlangen ermittelt werden (Geue et al., 2001).

2.1.3 Mykoplasmen

Mykoplasmen gehören zur Klasse *Mollicutes* (Weisburg et al., 1989) und sind daher zellwandlose Bakterien. Sie gehören zu den kleinsten und einfachsten Prokaryoten (Thompson et al., 2011). Sie haben sich evolutionär aus Gram-positiven Bakterien über Reduktion ihres Genoms mit Verlust der Fähigkeit, eine Zellwand auszubilden, entwickelt (Woese et al., 1980; Neimark, 1986). Mykoplasmen kommen bei Menschen, Säugetieren, Reptilien, Fischen, Arthropoden und Pflanzen vor (Thompson et al., 2011).

Mykoplasmen sind bekannte Erreger von Infektionen der oberen Atemwege bei Schildkröten (Jacobson et al., 2014). Über die Mykoplasmenflora bei weiteren Reptilien ist bisher wenig bekannt. Im Jahre 2006 konnte *Mycoplasma iguanae* sp. nov. bei zwei grünen Leguanen (*Iguana iguana*) aus multifokalen vertebraalen Abszessen isoliert und beschrieben werden (Brown et al., 2006). Im Jahr darauf konnte *Mycoplasma insons* sp. nov. aus Choanen und Trachea bei einigen Leguanen isoliert und charakterisiert werden. Er wurde vermutet, dass

Mycoplasma insons sp. nov. zur autochtonen Mikrobiota des oberen Respirationstraktes gehört (Brown et al., 2007).

Bei Schlangen konnten bisher in drei Studien Mykoplasmen-induzierte Erkrankungen beobachtet werden. Im Jahre 1997 konnten bei einem *Python bivittatus* mit proliferativer lymphozytärer Pneumonie und Tracheitis nicht näher identifizierte Mykoplasmen (*Mycoplasma* sp.) nachgewiesen werden. Die erkrankte Schlange war eine aus vier in einem privaten Haushalt gehaltene Schlangen, von denen zwei bereits an einer Pneumonie verstorben sind. Die Schlange erholte sich nicht von der Erkrankung, sie weigerte sich zu fressen und zeigte Maulatmung beim Handling und wurde schließlich acht Monate nach dem Krankheitsausbruch euthanasiert (Penner et al., 1997).

Nicht näher identifizierte Mykoplasmen konnten auch bei zwei weiteren Pythons nachgewiesen werden. Eine der beiden Schlangen zeigte respiratorische Symptome und die andere wies sonstige klinische Symptome auf. Bei beiden wurde in der pathologischen Untersuchung eine Pneumonie festgestellt. Bei einem Tier konnten keine anderen bakteriellen oder viralen Erreger nachgewiesen werden (Schmidt et al., 2013).

Des Weiteren konnten bei drei *Morelia spilota* Vertreter der Gattung *Mycoplasma* mittels PCR nachgewiesen werden. Die Teppichpythons wiesen Entzündungen der Maulschleimhaut auf, die sich bei der pathologischen Untersuchung als purulente bis purulent-nekrotisierende Stomatitiden herausstellten (Marschang et al., 2016).

2.1.4 Mykobakterien

Mykobakterien sind Gram-positive, aerobe, säurefeste Bakterien. Sie werden aufgrund ihres Auftretens und der verursachten Erkrankungen in Erreger des *Mycobacterium tuberculosis*-Komplexes, *M. leprae* und in nicht-tuberkulöse Mykobakterien wie *M. avium* unterteilt (Soldati et al., 2004). Nicht-tuberkulöse Mykobakterien kommen ubiquitär in der Umwelt vor. Diese Mykobakterien können bei Menschen gelegentlich und bei Tieren häufiger zu Erkrankungen führen (Tortoli, 2009). Zu den nicht-tuberkulösen Mykobakterien gehört u.a. *M. avium*, der in die vier Unterarten *M. avium* ssp. *avium*, *M. avium* ssp. *silvaticum*, *M. avium* ssp. *paratuberculosis* und ‚*M. avium* ssp. *hominissuis*‘ unterteilt wird (Thorel et al., 1990; Turenne et al., 2008). Die beiden erstgenannten Unterarten lösen bei Vögeln tuberkulöse

Krankheitsbilder wie die Geflügeltuberkulose aus (McDiarmid, 1984; Dvorska et al., 2003). *M. avium* ssp. *paratuberculosis* ist bei Wiederkäuern als Erreger der John'schen Krankheit oder Paratuberkulose bekannt (Harris und Barletta, 2001) und spielt eventuell auch beim Morbus Crohn der Menschen eine Rolle (Feller et al., 2007). ‚*M. avium* ssp. *hominisuis*‘ ist ein opportunistisches Pathogen bei Schweinen mit zoonotischem Potential (Slany et al., 2016; Tortoli, 2009).

Bei Reptilien stellen sich Mykobakterien-Infektionen in Form von granulomatösen Veränderungen in verschiedenen Organsystemen dar (Ebani et al., 2012). Folgende Mykobakterien konnten bereits bei Reptilien nachgewiesen werden: *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. marinum*, *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. ulcerans*, *M. confluentis*, *M. haemophilum*, *M. hiberniae*, *M. neoaurum* und *M. nonchromogenicum* (Soldati et al., 2004). Die Übertragungswege von Mykobakterien sind bei Reptilien unbekannt. Einflüsse wie Stress oder falsche Ernährung, die das Immunsystem beeinflussen, erhöhen jedoch das Risiko einer Infektion (Ebani et al., 2012). Da die meisten Mykobakterien ein zoonotisches Potential aufweisen sind hygienische Maßnahmen beim Handling von Reptilien einzuhalten (Ebani et al., 2012).

2.2 Pilzliche Infektionserreger

Bisher konnten zahlreiche Pilzarten wie z.B. Vertreter der Gattungen *Aspergillus*, *Candida*, *Penicillium* und *Geotrichum* bei Reptilien ohne Krankheitssymptome nachgewiesen werden (Schumacher, 2003).

Nichtsdestotrotz treten auch pathogene Pilze in den letzten Jahren gehäuft auf, die weltweit zur massiven Dezimierung von Wildtierpopulationen geführt haben (Fisher et al., 2012).

Bei Amphibien spielt der hochpathogene Chytridpilz *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) eine wichtige Rolle. Bd weist eine globale Verbreitung auf und ist für den größten Biodiversitätsverlust bei Froschlurchen seit Jahrhunderten verantwortlich (Scheele et al., 2019). Bei Salamandern tritt *Batrachochytrium salamandrivorans* (Bsal) als Infektionserreger auf (Martel et al. 2013). Klinisch stellen sich Infektionen mit dem Chytridpilz als oberflächliche

Hautläsionen sowie tiefgreifende Geschwüre dar. Die Mortalität ist hoch und Tiere versterben rasch nach einer Infektion (Martel et al. 2013; Martel et al., 2014; Stegen et al., 2017).

Winterschlafhaltende Fledermäuse sind von dem Erreger der Weißnasenkrankheit, *Pseudogymnoascus destructans*, betroffen (Lorch et al., 2011; Minnis und Lindner, 2013; Warnecke et al., 2012). Das Krankheitsbild ist bei verschiedenen Fledermausarten unterschiedlich stark ausgeprägt (Langwig et al., 2012; Langwig et al., 2016). Neben asymptomatischen Verläufen treten gehäuft entzündliche Veränderungen in der Nasenregion, aber auch Todesfälle bei einigen Fledermausarten auf (Cryan et al., 2010; Meteyer et al., 2009)

Bei Schlangen stellt der Pilz *Ophidiomyces ophidiicola* die größte Bedrohung für wildlebende Populationen vor allem in Nordamerika dar (Allender et al., 2011). Der Pilz löst Erkrankungen wie Hautulzera, lokalisierte Hautverdickungen und Ödeme im Gesicht aus (Lorch et al. 2015). Eine hohe Morbidität und Mortalität konnten bisher bei Waldklapperschlangen (*Crotalus horridus*) und bei Massassauga-Klapperschlangen (*Sistrurus catenatus*) (Allender et al., 2011; Clark et al., 2011) beobachtet werden.

Ophidiomyces ophidiicola verursacht ausschließlich bei Schlangen Erkrankungen (Franklinos et al., 2017). Bisher ist ungeklärt, ob dieser Pilz in Nordamerika eingeschleppt oder ein natürlich vorkommender Erreger ist, der in den letzten Jahren durch Umweltveränderungen und Habitatsverlust vermehrt Erkrankungen hervorruft (Lorch et al., 2016).

Auch in Europa wurde *Ophidiomyces ophidiicola* bereits 1980 bei in menschlicher Obhut gehaltenen Schlangen mit auffälligen Hautläsionen nachgewiesen (Sigler et al., 2013). Berichte über größere Fallzahlen bei wildlebenden Schlangen waren bis 2016 allerdings auf das östliche Nordamerika beschränkt (Lorch et al., 2016). In einer Feldstudie konnte 2017 erstmalig *Ophidiomyces ophidiicola* auch in wildlebenden Schlangen in Europa nachgewiesen werden, wobei der Pilz in weiten Teilen Großbritanniens und vereinzelt in der Tschechischen Republik detektiert werden konnte (Franklinos et al., 2017). Die europäischen Isolate von *Ophidiomyces ophidiicola* zeigten deutliche Unterschiede gegenüber jenen aus Nordamerika, was wiederum vermuten lässt, dass die Krankheitsausbrüche in Nordamerika nicht mit einem aus Europa eingeschleppten Pilz verursacht wurden (Franklinos et al., 2017). Darüber hinaus kann davon ausgegangen werden, dass Umweltveränderungen wie Habitatsverlust und Klimawandel sowie Inzucht-Depressionen und Primärerkrankungen wesentlich zu den Ausbrüchen von

Ophidiomyces ophidiicola in Nordamerika beigetragen haben (Lorch et al., 2016; Clark et al., 2011; Franklins et al., 2017).

2.3 Virale Infektionserreger

Arenaviren

Seit den frühen 2010er Jahren ist bekannt, dass Arenaviren die Auslöser der „Inclusion Body Disease“ sind (Stenglein et al., 2012). Die durch Arenaviren ausgelöste ZNS-Symptomatik ist allerdings schon seit den 1970er Jahren bei *Python bivittatus* bekannt (Schumacher et al., 1994). Seither konnten weitere Symptome wie Regurgitieren, Stomatitis, Pneumonie und Rundzelltumore sowohl bei Pythons als auch Boas beschrieben werden (Chang et al., 2010). Die Klassifikation des Erregers als eines der zur Familie der *Arenaviridae* gehörenden Viren führte zu einer Unterteilung der Virusfamilie in die Gattungen *Mammarenavirus* und *Reptarenavirus* (Radoshitzky et al., 2015; Abudurexity et al., 2020). Durch einige Studien konnte aufgezeigt werden, dass Schlangen häufig mit verschiedenen Reptarenaviren infiziert sein können (Hepojoki et al., 2015; Stenglein et al., 2015; Korzyukov et al., 2020). Auch die Gattung *Hartmanvirus* gehört zu den *Arenaviridae*, zu der das Haartman-Institute-Snake-Virus-1 (HISV-1) gezählt wird (Hepojoki et al., 2018).

Paramyxoviren

Die Familie der *Paramyxoviridae* (PMV) gehört zur Ordnung *Mononegavirales* (Amarasinghe et al., 2019). Paramyxoviren sind große, behüllte RNA-Viren, die sowohl bei Säugetieren als auch bei Vögeln, Reptilien und Fischen auftreten können. Die Übertragung erfolgt in den meisten Fällen aerogen und immer horizontal. Eine Infektion über Vektoren ist nicht bekannt (Rima et al., 2019). Bis auf das sogenannte Sunshine-Virus gehören alle bisher bekannten Erreger zur Gattung *Ferlavirus*. Hierbei zählen Schlangen zu den am häufigsten betroffenen Reptilien (Hyndman et al., 2013). Klinisch manifestiert sich eine PMV-Infektion unterschiedlich und die Symptome sind meist unspezifisch. Zu diesen zählen Anorexie, Regurgitation, akute Atemnot, Stridor, Pneumonie, Diarrhö, Kopfzittern und das Sternendeuterphänomen. Des Weiteren kann es auch zu perakuten Todesfällen kommen (Sand et al., 2004).

Adenoviren

Adenoviren werden als Auslöser von Gastroenteritiden, Hepatitiden, Nephritiden, Pneumonien und Enzephalitiden angesehen (Heldstab und Bestetti, 1985; Schumacher et al., 1994). Es sind drei verschiedene Adenoviren bei Schlangen bekannt, nämlich SnAdV-1, SnAdV-2 und SnAdV-3 (Garner et al., 2008; Abbas et al., 2011). Diese gehören zur Familie *Atadenoviridae* (Gilson et al., 2016). Bisher konnten diese Viren nur bei in menschlicher Obhut gehaltenen Schlangen nachgewiesen werden (Harrach et al., 2019).

Iridoviren

Zur Familie der *Iridoviridae* gehören fünf Gattungen: *Chloriridovirus*, *Iridovirus*, *Lymphocystivirus*, *Megalocytivirus* und *Ranavirus* (Chinchar et al., 2009), wobei letztere für Reptilien bedeutsame Erreger beinhaltet (Hyatt et al., 2002; Marschang et al., 1999). Ranavirusinfektionen sind bei *Chondropython viridis* in Australien beschrieben. Die betroffenen Schlangen wiesen Ulcera in der Nasenschleimhaut, eine nekrotisierende Pharyngitis und Lebernekrosen auf (Hyatt et al., 2002).

Überdies ist das zu den *Iridoviridae* gehörende Erythrocytic-Necrosis-Virus (ENV) für zytoplasmatische Einschlüsse in Erythrozyten verantwortlich (De Sousa und Weigl, 1976; Stehbens und Johnson, 1966). Die Krankheitsbilder der ENV-Infektion sind nicht vollständig geklärt. In einem Fallbericht wird von Anämie bei *Bothrops moojeni* berichtet (Johnsrude et al., 1997). In einem weiteren Fall konnte bei *Thamnophis sauritus sackenii* eine makrozytäre, hypochrome, regenerative Anämie mit Verdacht auf immunmedierte Erythrolyse diagnostiziert werden. Weiters wies die Schlange einen schlechten Ernährungszustand auf, der allerdings auch auf kühle Temperaturen, denen die Schlange ausgesetzt war, zurückzuführen sein hätte können (Wellehan et al., 2008).

Reoviren

Die Familie der *Reoviridae* beinhaltet 12 Gattungen. Die bislang bei Reptilien nachgewiesenen Reoviren gehören alle zur Gattung *Orthoreovirus*. Sie werden entweder aerogen oder fäkal-oral übertragen (Chappell et al., 2005). Reoviren konnten bisher in einigen Schlangenarten detektiert werden, so z.B. in einer *Python regius*, einer *Crotalus viridis* mit ZNS-Symptomatik und in mehreren *Ophedrys aestivus* mit Lebernekrosen (Ahne et al., 1987; Vieler et al., 1994;

Gál et al., 2009) Außerdem konnten Reoviren aus drei *Boa constrictor* mit Inclusion-Body-Disease in Deutschland isoliert werden (Marschang et al., 2001). Mit diesen Isolaten wurde eine Transmissionsstudie durchgeführt, bei der jedoch keine Krankheitssymptome oder pathologischen Veränderungen bei den experimentell infizierten Schlangen festgestellt werden konnten, trotz Virusnachweis bis zu 18 Wochen *post infectionem* (Schragen, 2006).

2.4 Parasitäre Infektionserreger

Protozoen

Cryptosporidien

Cryptosporidien gehören zu den Apicomplexa und können bei einer Reihe von Vertebraten Erkrankungen hervorrufen. Klinisch stellt sich eine Infektion mit Symptomen wie Anorexie, Lethargie, Regurgitieren, Schwellungen in der Mitte des Körpers und Gewichtsverlust dar (Fayer, 1997). Bei vielen Tierarten ist die Erkrankung meist selbstlimitierend, bei Reptilien jedoch häufig chronisch und bei Schlangen gelegentlich tödlich (Xiao et al., 2004). Bei Schlangen und Echsen wurden bislang *Cryptosporidium serpentis* und *Cryptosporidium varanii* (syn. *C. saurophilum*) als Infektionserreger beschrieben (Xiao et al., 2004; Plutzer et al., 2007). *Cryptosporidium varanii* löst bei Echsen Symptome wie Gewichtsverlust und Schwellung des Abdomens aus. Bei Schlangen kann die Cryptosporidienart zwar nachgewiesen werden, die Infektion löst aber keine nennenswerten Symptome aus (Plutzer et al., 2007).

Kokzidien

Bei Reptilien führt *Caryospora* zu Symptomen wie Unruhe, Anorexie und Gewichtsverlust. Des Weiteren sind viele *Eimeria*-Spezies bei Reptilien bekannt, aber relativ wenigen konnten Krankheitssymptomen zugeordnet werden (Scullion und Scullion, 2009). Es liegt allerdings ein Bericht über einige *Eimeria*-Arten vor, die katarrhalische und diphteroide Entzündungen des Darmtrakts bei Schlangen auslösen konnten (Lehman, 1972).

Amöben

Das Hauptaugenmerk liegt auf Krankheiten, die durch *Entamoeba invadens* hervorgerufen werden. Eine Studie konnte dabei aufzeigen, dass bei einigen Schlangenarten Erkrankungen durch *Entamoeba invadens* in Abhängigkeit von der Haltungstemperatur ausgelöst werden (Barrow und Stockton, 1960). Klinisch stellt sich eine Erkrankung unterschiedlich dar. Betroffene Tiere zeigen Dysenterie und gelegentlich Erbrechen. Im späteren Krankheitsverlauf können abdominale Schwellungen, Kloakenprolaps sowie Leberabszesse und -nekrosen auftreten. Auch in anderen Organsystemen wie Lunge, Milz, Pankreas und Blutgefäßen konnte *Entamoeba invadens* bereits nachgewiesen werden. Infizierte Tiere können an den durch die Parasiten hervorgerufenen entzündlichen Veränderungen versterben (Jacobson, 2007).

Nematoden

Strongyloides

Empfängliche Wirte werden mit L3-Larven von *Strongyloides* spp. infiziert. Während der Körperwanderung werden diese zu L4-Larven. Im Darm siedeln sich dann die parasitischen Weibchen an, um Eier zu produzieren, die mit dem Kot ausgeschieden werden. Aus den Eiern werden in den Exkrementen L1-Larven. Diese entwickeln sich entweder über L2-L4 zu freilebenden Adulten oder zu infektiösen L3 (Viney und Lok, 2007). Klinisch können *Strongyloides* zu Enteritiden führen (Beck und Pantchev, 2013).

Kalicephalus

Kalicephalus spp. haften mit ihren Zähnen an der Mucosa der Gastrointestinaltrakts, um dadurch an Blutgefäße zu gelangen (Frank, 1985; Kavitha et al., 2014). Klinisch stellt sich eine Infektion mit den blutsaugenden Parasiten entweder als milde Enteritis oder als hämorrhagisch-nekrotische Gastroenteritis mit bakterieller Sekundärinfektion dar (Kavitha et al., 2014; Schad, 1962).

Rhabdias

Colubridae und *Viperidae* sind häufiger mit *Rhabdias* spp. infiziert. Die Infektion kann zu einer verminösen Pneumonie mit bakterieller Sekundärinfektion führen (Hallinger et al., 2020).

3. Material und Methoden

3.1 Vorbereitungen für die Probennahme

Es wurden hierfür sterile 2 ml Tubes mit einem Transportmedium befüllt und bis zur eigentlichen Probennahme bei -20°C eingefroren. Als Transport – und Probenaufbereitungsmedium wurde 2-SP-Medium verwendet, welches nach folgender Rezeptur hergestellt wurde (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien):

- a) 48,5 g Saccharose
- b) 2,1 g K_2HPO_4
- c) 1,1 g KH_2PO_4
- d) 1000 ml Aqua dest.
- e) 120 ml Pferdeserum

Reagenzien a bis d wurden gemischt und anschließend autoklaviert. Reagenz e wurde nach dem Abkühlen auf 45°C dem Medium hinzugefügt.

3.2 Choanen – und Kloakentupfer

Die Proben wurden vom betreuenden Tierarzt entnommen, wobei die Choanen von allen Schlangen und die Kloake von Tieren beprobt wurden, sofern dies ihre Größe zuließ. Insgesamt wurden 250 Tupferproben genommen.

Für die Beprobung wurden FLOQSwabs™ Model 516C (Copan, Brescia, Italien) verwendet. Zur Beprobung der Choanen wurde der Unterkiefer der Schlange mit einem jeweils frischen Holzspatel vorsichtig geöffnet und offengehalten. Der Tupfer wurde exakt in den Choanenspalt eingeführt und die Probe unter mehrfachem Drehen sowie Vor- und Zurückbewegen entnommen.

Durch das Drehen wurde sichergestellt, ausreichend Schleimhautzellen abzustreichen und dadurch auch ausreichend Probenmaterial im Hinblick auf die Untersuchung von intrazellulären Mikroorganismen (Chlamydien, Mykoplasmen) zu gewinnen. Anschließend

wurde der Tupfer in ein 2 ml Tube mit 2-SP-Transportmedium verbracht und der Plastikstiel, mit einer zuvor in Alkohol desinfizierten und dann abgeflämmten Schere auf die passende Länge gekürzt. Das Desinfizieren mit Alkohol und Abflämmen wurde vor jedem Tupfer wiederholt. Die Probengefäße wurden mit Nummern beginnend mit „1“ gekennzeichnet und diese Nummer auch in einer vorgedruckten Liste eingetragen.

Im Anschluss wurde die Kloakentupferprobe genommen, um einen übersichtlichen sowie möglichst immer gleich ablaufenden Arbeitsablauf zu gewährleisten und einen möglichst hohen Sicherheitsfaktor zu ermöglichen. Zur Kloakenbeprobung wurde ein steriler Tupfer unter anheben der Kloakenschuppe und unter Drehung ausreichend tief in die Kloake eingeführt. Nach erfolgter Probennahme wurde nach dem gleichen Prinzip verfahren wie bei den oben beschriebenen Choanentupfern.

Zur vollständigen Dokumentation wurden von jedem Individuum die Terrarienummer, Art, Geschlecht, Herkunft, die Verwandtschaftsform mit anderen Tieren im Bestand, Kontakttiere, sowie die letzte Fütterung notiert.

Tabelle 1: Stammdatenblatt der beprobten Schlangen

Probe	Ch/Kl	Terra#	Art	M/W	WF/NZ/ZK
1/2	Ch/Kl	24	<i>Vipera latastei gaditana</i>	M	NZ 2014
3/4	Ch/Kl	25	<i>Vipera aspis francisciredi</i>	M	NZ 2014
5/6	Ch/Kl	21	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ 2015
7/8	Ch/Kl	46	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ 2017
9/10	Ch/Kl	46	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ 2017
11/12	Ch/Kl	46	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	M	NZ 2017
13/14	Ch/Kl	57	<i>Vipera aspis aspis</i>	M	NZ 2016
15	Ch	Fr	<i>Vipera aspis aspis</i>	W	NZ 2019
16	Ch	Fr	<i>Vipera aspis aspis</i>	W	NZ 2019
17/18	Ch/Kl	58	<i>Montivipera wagneri</i>	M	NZ 2013
19/20	Ch/Kl	42	<i>Montivipera xanthina</i>	?	NZ 2017
21/22	Ch/Kl	Fr	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	M	NZ 2016
23/24	Ch/Kl	Fr	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ 2016
25/26	Ch/Kl	72	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ?

27/28	Ch/Kl	95	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	M	NZ?
29/30	Ch/Kl	95	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ 2016
31/32	Ch/Kl	95	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ 2016
33/34	Ch/Kl	22	<i>Vipera aspis hugyi</i>	W	NZ 2016
35/36	Ch/Kl	22	<i>Vipera aspis hugyi</i>	W	NZ 2016
37/38	Ch/Kl	22	<i>Vipera aspis hugyi</i>	W	NZ?
39	Ch	55	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	M	NZ?
40/41	Ch/Kl	55	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	M	NZ?
42/43	Ch/Kl	55	<i>Vipera ammodytes ammodytes</i>	W	NZ?
44/45	Ch/Kl	49a	<i>Vipera aspis hugyi</i>	W	NZ 2017
46/47	Ch/Kl	49b	<i>Montivipera radei</i>	W	NZ 2018
48/49	Ch/Kl	111	<i>Cerastes cerastes</i>	W	WF
50/51	Ch/Kl	111	<i>Cerastes cerastes</i>	W	WF
52/53	Ch/Kl	111	<i>Cerastes cerastes</i>	W	WF
54/55	Ch/Kl	111	<i>Cerastes cerastes</i>	M	WF
56/57	Ch/Kl	113	<i>Daboia mauretanic</i>	M	NZ 2004
58/59	Ch/Kl	113	<i>Daboia mauretanic</i>	W	NZ 2004
60/61	Ch/Kl	113	<i>Daboia mauretanic</i>	W	NZ 2004
62/63	Ch/Kl	113	<i>Daboia mauretanic</i>	W	NZ 2004
64/65	Ch/Kl	113	<i>Daboia mauretanic</i>	W	NZ 2004
66/67	Ch/Kl	51	<i>Daboia palaestinae</i>	M	NZ 2004
68/69	Ch/Kl	51	<i>Daboia palaestinae</i>	W	NZ 2015
70/71	Ch/Kl	51	<i>Daboia palaestinae</i>	M	NZ 2015
72/73	Ch/Kl	107	<i>Bitis rhinoceros</i>	W	NZ 2016
74/75	Ch/Kl	109	<i>Bitis arietans</i>	M	NZ 2012
76/77	Ch/Kl	117	<i>Atheris squamigera</i>	W	NZ 2018
78/79	Ch/Kl	53	<i>Echis ocellatus</i>	W	NZ 2016
80	Ch	AB 3	<i>Parias schultzei</i>	M	NZ 2018
81/82	Ch/Kl	47	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	M	NZ?
83/84	Ch/Kl	47	<i>Calloselasma rhodostoma</i>	W	NZ 2015
85/86	Ch/Kl	18	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	M	NZ?

87/88	Ch/Kl	18	<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	M	NZ?
89/90	Ch/Kl	105	<i>Protobothrops jerdonii bourreti</i>	W	NZ 2008
91/92	Ch/Kl	105	<i>Protobothrops jerdonii bourreti</i>	M	NZ 2008
93/94	Ch/Kl	101	<i>Naja naja</i>	W	NZ 2009
95/96	Ch/Kl	101	<i>Naja naja</i>	W	NZ 2015
97/98	Ch/Kl	13	<i>Naja atra</i>	W	NZ 2010
99	Ch	13	<i>Naja atra</i>	M	NZ 2010
100/101	Ch/Kl	13	<i>Naja atra</i>	M	NZ 2010
102/103	Ch/Kl	34	<i>Naja atra</i>	W	WF 2000
104/105	Ch/Kl	34	<i>Naja atra</i>	M	WF 2000
106/107	Ch/Kl	30	<i>Naja sputatrix</i>	W	NZ 2011
108/109	Ch/Kl	30	<i>Naja sputatrix</i>	M	NZ 2011
110/111/112	Ch/Kl/K l	67	<i>Naja sputatrix</i>	M	NZ 2018
113/114	Ch/Kl	20	<i>Naja sputatrix</i>	W	NZ 2018
115	Ch	AB	<i>Naja sputatrix</i>	W	NZ 2019
116	Ch	Box 1	<i>Naja sputatrix</i>	W	NZ 2019
117/118	Ch/Kl	97	<i>Naja siamensis</i>	M	NZ 90er
119/120	Ch/Kl	146	<i>Naja siamensis</i>	W	NZ 2016
121/122	Ch/Kl	149	<i>Naja siamensis</i>	M	NZ 2016
123/124	Ch/Kl	73	<i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>	M	NZ 2016
125/126	Ch/Kl	73	<i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>	M	NZ 2016
127/128	Ch/Kl	91	<i>Trimeresurus puniceus</i>	M	NZ 2016
129/130	Ch/Kl	74	<i>Trimeresurus albolabris</i>	W	NZ 2016
131/132	Ch/Kl	74	<i>Trimeresurus albolabris</i>	W	WF
133/134	Ch/Kl	133	<i>Trimeresurus albolabris</i>	M	NZ 2016
135/136	Ch/Kl	133	<i>Trimeresurus albolabris</i>	W	NZ 2016
137/138	Ch/Kl	134	<i>Trimeresurus trigonocephalus</i>	W	NZ 2015
139/140	Ch/Kl	87	<i>Parias flavomaculatus</i>	W	NZ 2018
141/142	Ch/Kl	143	<i>Parias flavomaculatus</i>	M	NZ 2013
143/144	Ch/Kl	121	<i>Parias schultzei</i>	W	NZ 2017
145/146	Ch/Kl	124	<i>Parias mcgregori</i>	M	NZ 2017

147/148	Ch/Kl	122	<i>Parias mcgregori</i>	W	NZ 2014
149/150	Ch/Kl	123	<i>Parias mcgregori</i>	W	NZ 2014
151/152	Ch/Kl	3	<i>Crotalus culminatus</i>	M	NZ 2015
153/154	Ch/Kl	3	<i>Crotalus culminatus</i>	W	NZ 2015
155/156	Ch/Kl	2	<i>Crotalus basiliscus</i>	M	NZ 2014
157/158	Ch/Kl	2	<i>Crotalus basiliscus</i>	W	NZ 2014
159/160	Ch/Kl	4/6	<i>Crotalus atrox</i>	M	NZ 2014
161/162	Ch/Kl	4/6	<i>Crotalus atrox</i>	W	NZ 2017
163/164	Ch/Kl	4/6	<i>Crotalus atrox</i>	M	NZ 2014
165/166	Ch/Kl	38	<i>Crotalus caliginis</i>	W	NZ 2013
167/168	Ch/Kl	38	<i>Crotalus caliginis</i>	M	NZ 2013
169/170	Ch/Kl	36	<i>Crotalus polystictus</i>	M	NZ 2009
171/172	Ch/Kl	35	<i>Crotalus pricei pricei</i>	W	NZ 2015
173/174	Ch/Kl	35	<i>Crotalus pricei pricei</i>	W	NZ 2015
175/176	Ch/Kl	10	<i>Crotalus pyrrhus</i>	M	NZ 2011
177/178	Ch/Kl	10	<i>Crotalus pyrrhus</i>	W	NZ 2015
179/180	Ch/Kl	10	<i>Crotalus pyrrhus</i>	W	NZ 2011
181/182	Ch/Kl	12	<i>Crotalus enyo furvus</i>	M	NZ 2013
183/184	Ch/Kl	12	<i>Crotalus enyo furvus</i>	W	NZ 2013
185/186	Ch/Kl	8	<i>Crotalus horridus</i>	M	NZ 2015
187/188	Ch/Kl	8	<i>Crotalus horridus</i>	W	NZ 2015
189/190	Ch/Kl	8	<i>Crotalus horridus</i>	M	NZ 1999
191/192	Ch/Kl	8	<i>Crotalus horridus</i>	M	NZ 1999
193/194	Ch/Kl	11	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	W	NZ 2009
195/196	Ch/Kl	11	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	M	NZ 2004
197/198	Ch/Kl	11	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	W	NZ 2012
199/200	Ch/Kl	11	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	W	NZ 2013
201/202	Ch/Kl	92	<i>Agkistrodon bilineatus</i>	M	NZ 2017
203/204	Ch/Kl	75	<i>Agkistrodon contortrix pictigaster</i>	W	NZ 2013
205/206	Ch/Kl	75	<i>Agkistrodon contortrix pictigaster</i>	M	NZ 2013
207/208	Ch/Kl	75	<i>Agkistrodon contortrix pictigaster</i>	W	NZ 2013

209/210	Ch/Kl	14	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	M	NZ 2009
211/212	Ch/Kl	14	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	W	NZ 2009
213/214	Ch/Kl	14	<i>Agkistrodon contortrix contortrix</i>	M	NZ 2009
215/216	Ch/Kl	27	<i>Agkistrodon contortrix mokasen</i>	W	NZ 2011
217/218	Ch/Kl	27	<i>Agkistrodon contortrix mokasen</i>	M	NZ 2011
219/220	Ch/Kl	27	<i>Agkistrodon contortrix mokasen</i>	W	NZ 2011
221/222	Ch/Kl	54	<i>Porthidium ophryomegas</i>	M	NZ 2015
223/224	Ch/Kl	54	<i>Porthidium ophryomegas</i>	W	NZ 2015
225/226	Ch/Kl	84	<i>Bothrops asper</i>	M	NZ 2019
227/228	Ch/Kl	18	<i>Bothrops asper</i>	W	NZ 2019
229/230	Ch/Kl	15	<i>Agkistrodon taylori</i>	M	NZ 2017
231/232	Ch/Kl	15	<i>Agkistrodon taylori</i>	W	NZ 2017
233/234	Ch/Kl	15	<i>Agkistrodon taylori</i>	W	NZ 2017
235/236	Ch/Kl	59	<i>Agkistrodon venezuelaensis</i>	M	NZ 2014
237/238	Ch/Kl	59	<i>Agkistrodon venezuelaensis</i>	W	NZ 2014
239/240	Ch/Kl	59	<i>Agkistrodon venezuelaensis</i>	M	NZ 2014
241/242	Ch/Kl	70	<i>Crotalus horridus</i>	W	NZ 2016
243/244	Ch/Kl	70	<i>Crotalus horridus</i>	M	NZ 2016
245/246	Ch/Kl	68	<i>Crotalus unicolor</i>	M	NZ 2018
247/248	Ch/Kl	68	<i>Crotalus unicolor</i>	W	NZ 2018
249/250	Ch/Kl	68	<i>Crotalus unicolor</i>	W	NZ 2018

AB Aufzuchtbecken, Ch Choane, Kl Kloake, M männlich, W weiblich, NZ Nachzucht, WF Wildfang,
ZK Zukauf

3.4 Kultivierung

3.4.1 Bakterien

Die kulturell-bakteriologische Untersuchung wurde ausschließlich an Choanentupferproben durchgeführt. Hierfür wurden mit gammasterilen Impfschlingen aus Polystyrol (Sarstedt AG & Co, Nürnberg, Deutschland) Verdünnungsausstriche auf die nachstehenden Agarmedien hergestellt:

- Columbia-Agar mit 5% Schafblut (BD, Wien, Österreich)
- MacConkey-Agar (BD, Wien, Österreich) (selektives Medium zur Isolierung Gram-negativer Bakterien)
- CN (Colistin/Nalidixinsäure)-Agar mit 5% Schafblut (BD, Wien, Österreich) (selektives Medium zur Isolierung Gram-positiver Bakterien)

Die Kulturansätze wurden aerob bei 28°C für 24 h inkubiert.

Eine weitere Columbia-Agarplatte wurde unter anaeroben Bedingungen in einem Anaerobiertopf mit einem Anerobier-Gas-Pak (BD, Wien, Österreich) bei 28°C für 48 h inkubiert.

Nach Bebrütung wurden das bakterielle Wachstum semiquantitativ bestimmt und die Koloniemorphologie auf Unterschiede beurteilt. Bakteriellles Wachstum wurde wie folgt bewertet: vereinzelt (+) -unter 10 KbE (Kolonie-bildende Einheit) ausschließlich im Erstausrich, ggr. + - 11 bis 50 KbE im Erstausrich, mgr. ++ - KbE im Erstausrich nicht mehr zählbar und bereits KbE im Zweitausrich, hgr. +++ - KbE auch im Dritausrich.

Anschließend wurden morphologisch unterschiedliche Kolonien auf Columbia bzw. MacConkey Agar subkultiviert, bei 28°C für 24 h inkubiert und hierbei Reinkulturen gewonnen.

3.4.2 Pilze

Für die Kultivierung von Pilzen wurde ein Ausstrich auf Sabouraud-Agar mit Gentamicin und Chloramphenicol (BD, Wien, Österreich) hergestellt. Die Agarplatten wurden bei

Raumtemperatur (25-28°C) für mindestens fünf Tage inkubiert und anschließend täglich auf pilzliches Wachstum kontrolliert. Bei Wachstum wurde die Koloniemorphologie beurteilt und dabei jedes Pilzisolat einem der insgesamt 28 ermittelten Morphotypen zugeordnet.

3.4.3 Mykoplasmen

Zur Kultivierung von Mykoplasmen wurden 200 µl der Probe (Tupfer in 2-SP Transportmedium) 3 ml modifiziertem SP4-Medium (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) transferiert und anschließend bei 28°C aerob inkubiert.

Es folgte eine tägliche Blickkontrolle der Flüssigkulturen, wobei auf Farbumschlag und Trübung geachtet wurde. Bei einer Feststellung eines Farbumschlages mit/ohne Trübung wurden 100 µl der Flüssigkultur auf modifiziertem SP4-Agar (Institut für Mikrobiologie, Veterinärmedizinische Universität Wien) verbracht und anschließend bei 28°C und 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. In weiterer Folge wurden die Agarplatten regelmäßig stereomikroskopisch auf Mykoplasmenwachstum überprüft. Bei Ausbildung von Mykoplasmen-Kolonien wurde Einzelkolonien mithilfe einer Pasteurpipette ausgestanzt, in 3 ml SP4-Medium verbracht und bei 28°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase (beginnender Farbumschlag) inkubiert. Zur Identifizierung der gewonnenen Mykoplasmenisolate wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie angewandt (Spergser et al., 2019). Bei massenspektrometrisch nicht identifizierbaren Mykoplasmenisolaten wurden phylogenetische Marker (16S rRNA-Gen, 16S-23S intergenische Spacer-Region, *rpoB*) amplifiziert und einer Sequenzanalyse unterzogen (Spergser et al., 2020).

3.5. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zur Identifizierung der gewonnenen Bakterienisolate wurde die MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) durchgeführt. Hierfür wurde eine geringe Menge von Einzelkoloniematerial der angefertigten Reinkulturen mithilfe eines sterilen Zahnstochers auf eine MALDI-Trägerplatte (96-Feld-Stahlplatte) aufgetragen und mit 1 µl 70%iger Ameisensäure (Sigma Aldrich, Wien, Österreich) überschichtet. Nach Lufttrocknung wurden je 1 µl α -Cyano-4-Hydroxymethylsäure-Matrixlösung auf jedes benutzte Feld aufgetragen und erneut luftgetrocknet. Danach folgte die massenspektrometrische Analyse in einem Microflex LT Biotyper (Bruker, Deutschland) unter Anwendung der FlexControl 3.4 und MBT Compass Explorer 4.1 Software-Systeme. Die dabei generierten Spektren wurden automatisch mit einer systemintegrierten sowie einer institutseigenen Referenzspektren-Datenbank verglichen. Dabei wurde ein numerischer Identifikationswert (Score) berechnet und so die Übereinstimmung der gemessenen Probe mit den Referenzspektren in der Datenbank ermittelt. Bei einem Score > 2.00 galt die Art diagnose als gesichert, bei Werten zwischen 1.70 und 1.99 konnte die Probe auf Gattungsebene identifiziert werden, bei Scores < 1.70 war das Bakterienisolat massenspektrometrisch nicht identifizierbar. Für Isolate mit Scores < 1.99 wurden schließlich sogenannte MSPs (Main Spectrum Profiles) mithilfe der MSP-Funktion der MBT Compass Explorer 4.1 Software generiert und kontinuierlich in die Datenbank aufgenommen werden. Hierzu wurden vorerst 24 massenspektrometrische Messungen an acht Feldern der aufgetragenen Proben durchgeführt und die dabei generierten Spektren mittels FlexAnalysis 3.4 Software auf Qualitätskriterien überprüft. Nur qualitativ hochwertige Spektren (mindestens 18) wurden für die Erstellung eines MSPs verwendet. Nach Datenbankaufnahme konnten vormals nicht identifizierbare Isolate den neuerstellten MSPs zugeordnet und dabei spektrale Gruppen gebildet werden. Zur endgültigen Identifizierung der Isolate wurden schließlich Repräsentanten der spektralen Gruppen ausgewählt und mittels 16S rRNA-Gensequenzanalyse (siehe unten) klassifiziert. Massenspektrometrisch als *Salmonella enterica* identifizierte Isolate wurden zur weiteren Typisierung an die AGES Graz versandt.

3.6 PCR

3.6.1 DNA-Extraktion

Zur Gewinnung von DNA aus Proben und von Bakterienisolaten wurde der *GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit* (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) sowie der *DNeasy® PowerSoil Kit* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) für Pilzisolat verwendet.

Zur DNA-Extraktion aus Proben und von Bakterienisolaten wurde wie folgt vorgegangen: Vorerst wurden 300 µl Probenmaterial (Tupfer in 2-SP Medium) oder eine Kolonie eines Bakterienisolats in 300 µl Resuspensionslösung verbracht und bei 6.500 x g für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum entstandenen Pellet wurden dann 180 µl Lyse T-Lösung, sowie 20 µl Proteinase K-Lösung zugegeben, anschließend gevortext und bei 55°C für 3 h im Thermomixer (Eppendorf AG, Wesseling, Deutschland) inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lyse C-Lösung hinzu pipettiert und bei 70°C für 10 min im Thermoblock (Eppendorf AG, Wesseling, Deutschland) lysiert. Danach wurden 200 µl 95%iger Alkohol beigemischt und für 10 sek gevortext. Zur Vorbereitung der Spezialfiltrerröhrchen wurde eine Filtereinheit in einem Röhrchen mit 500 µl Präparationslösung befüllt und bei 6.500 x g für 3 min zentrifugiert. In die so vorbereitete Filtereinheit wurden anschließend 500 µl des Proben- bzw. Bakterienlysats pipettiert und bei 6.500 x g für 1 min zentrifugiert. Das entstandene Filtrat wurde verworfen. Nun folgten zwei Waschvorgänge mit einer Waschlösung. Je Waschvorgang wurden 500 µl Waschlösung in den Filter pipettiert. Im ersten Waschvorgang wurde bei 6.500 x g für 1 min und im zweiten Waschvorgang bei 14.000 x g für 3 min zentrifugiert. Die beiden Durchläufe wurden verworfen. Die Filtereinheit wurde anschließend in ein neues Röhrchen überführt und mit 200 µl Elutionslösung befüllt. Nach 5minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Filtereinheit für 1 min bei 6.500 x g zentrifugiert und die DNA so eluiert. Die so gewonnene DNA wurde bei -20°C gelagert.

Zur DNA-Extraktion von Pilzisolaten wurde wie folgt vorgegangen: Zuerst wurde ausreichend Material einer Pilzkolonie ausgestanzt und in ein *PowerBead Tube* (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verbracht und für 5 sek gevortext. Anschließend wurden 60 µl der C1-Lösung

dazu pipettiert und erneut 5 sek gevortext. Danach wurden die *PowerBead Tubes* mithilfe eines Horizontalvortexers bei höchster Geschwindigkeit für 10 min geschüttelt. Anschließend wurden die Tubes für 30 sek bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen transferiert und mit 250 µl C2-Lösung gemischt, für 5 sek gevortext und für 5 min bei 5°C inkubiert. Es folgte ein Zentrifugierschritt bei 10.000 x g für 1 min. Unter Schonung der entstandenen Pellets wurden 600 µl des Überstandes in ein neues Röhrchen pipettiert und mit 200 µl C3-Lösung vermennt, für 5 sek gevortext und erneut für 5 min bei 5 °C inkubiert. Es folgte ein weiteres Zentrifugieren bei 10.000 x g für 1 min. Nun wurden 750 µl des Überstandes wieder in ein neues Röhrchen verbracht und mit 1200 µl C4-Lösung gemischt und für 5 sek gevortext. Anschließend wurden 675 µl des Überstands in eine Filtereinheit verbracht und bei 10.000 x g für 30 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt, bis das gesamte Gesamtvolumen zentrifugiert war. Danach wurde die Filtereinheit mit 500 µl C5-Lösung befüllt und bei 10.000 x g für 30 sek zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und die Filtereinheit anschließend abermals bei 10.000 x g für 1 min zentrifugiert. Die Filtereinheit wurde in ein neues Röhrchen verbracht mit 100 µl der C6-Lösung beschickt, bei 10.000 x g für 30 sek zentrifugiert und das so gewonnene DNA-Extrakt bei -20°C gelagert.

3.6.2 PCR

Zur Herstellung der PCR-Reaktionsgemische wurde *OneTaq[®] Quick-Load[®] DNA-Polymerase* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) verwendet. Je nach durchgeführter PCR wurden in die Reaktionsgemische die entsprechenden Primerpaare (Thermo Fisher Scientific, Wien, Österreich) in einer Konzentration von 25 pmol/μl pipettiert (siehe Tabelle 2). Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem Mastercycler[®] Nexus (Eppendorf AG, Wesseling, Deutschland).

Tabelle 2: Die für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer

Zielsequenz	Primer ID	Primer – Sequenz	Referenz
Mykobakterien 16S rRNA-Gen	Mycgen-F	5`-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3`	Wilton et al., 1992
	Mycgen-R	5`-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3`	
Eubakterien 16S rRNA-Gen	27f	5`-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG- 3`	Lane,1991
	1492r	5`-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3`	
Pilze <i>Internal- Transcribed- Spacer-Region</i> (ITS1-5.8 rRNA- ITS2)	ITS-1	5`-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`	Ferrer et al., 2001
	ITS-4	5`-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3`	
Chlamydien 16S rRNA-Gen	16SF	5`-GCGTGGATGAGGCATGCAA- 3`	Everett, 2000
	16SR	5`-GGAGGTGATCCAGCCCCA- 3`	
Chlamydien <i>omp2-Gen</i>	Ch1	5`-ATGTCCAAACTCATCAGACGAG- 3`	Hartley et al., 2001
	Ch2	5`-CCTTCTTTAAGAGGTTTTACC -3`	

Amplifikation des 16S rRNA-Gens von nicht identifizierbaren Bakterienisolaten

Die in dieser Arbeit mittels MALDI-TOF MS nicht identifizierbaren und somit einer taxonomischen Einordnung vorenthaltenen Bakterien wurden einer PCR-Amplifikation des 16S rRNA-Gens unterzogen und die erhaltenen Amplifikate anschließend sequenziert. Für die PCR-Amplifikation des 16S rRNA-Gens wurden die Primer 27f und 1492r verwendet.

Tabelle 3: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-Gen-Amplifikation

Bestandteil	Menge
OneTaq	12,5µl
Primer 27f	0,75µl
Primer 1492r	0,75µl
Template	2,5µl
ddH ₂ O	ad 25µl

Die PCR-Amplifikation erfolgte unter den in Tabelle 4 angeführten thermozyklischen Bedingungen.

Tabelle 4: Thermozyklische Bedingungen für die 16S rRNA-Gen Amplifikation

Schritt	°C	Dauer in Minuten	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	94°C	2 min	30
Annealing	50°C	1,5 min	
Elongation	72°C	5 min	
Finale Elongation	72°C	1 min	1

Amplifikation des 16S rRNA-Gens von Mykobakterien

Die gewonnenen Tupferproben wurden im Zuge der diagnostischen Aufarbeitung auch auf Mykobakterien untersucht. Zu diesem Zwecke wurde eine Mykobakterien-spezifische Sequenz

des 16S rRNA-Gens amplifiziert und im Anschluss sequenziert. Für die PCR-Amplifikation wurden die Primer Mycgen-F und Mycgen-R verwendet.

Tabelle 5: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-Gen-Amplifikation (Mykobakterien)

Bestandteil	Menge
OneTaq	20µl
Primer Mycgen-F	0,5µl
Primer Mycgen-R	0,5µl
Template	2,5µl
ddH₂O	1,5µl

Die PCR-Amplifikation erfolgte unter den in Tabelle 6 angeführten thermozyklischen Bedingungen.

Tabelle 6: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des 16S rRNA-Gens von Mykobakterien

Schritt	°C	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	1
Denaturierung	95°C	1 min	35
Annealing	61°C	30 sek	
Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1

Amplifikation der *Internal-Transcribed-Spacer-Region* (ITS1-5.8 rRNA-ITS2) von Pilzen

Die im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesenen Pilze wurden einer molekulargenetischen Klassifizierung durch Amplifikation und Sequenzierung der *Internal-Transcribed-Spacer-Region* (ITS1-5.8 rRNA-ITS2) unterzogen. Es wurde jeweils ein Repräsentant von morphologisch ähnlich Pilzisolaten analysiert. Für die PCR wurden die Primer ITS-1 und ITS-4 verwendet.

Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Amplifikation der *Internal-Transcribed-Spacer-Region* (ITS1-5.8 rRNA-ITS2)

Bestandteil	Menge
DNA-Polymerase	30µl
Primer ITS-1	2,7µl
Primer ITS-4	2,7µl
Template	2,5µl
ddH ₂ O	22µl

Die PCR-Amplifikation erfolgte unter den in Tabelle 8 angeführten thermozyklischen Bedingungen.

Tabelle 8: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation der *Internal-Transcribed-Spacer-Region* (ITS1-5.8 rRNA-ITS2)

Schritt	°C	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	18 sek	35
Annealing	52°C	30 sek	
Elongation	52°C	1,5 min	
Finale Elongation	72°C	10 min	1

Amplifikation des *omp2*-Gens von Chlamydien

Zum spezifischen Nachweis von Chlamydien wurde das *omp2*-Gen mittels PCR amplifiziert. Es wurden die Primer Ch1 und Ch2 verwendet.

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die *omp2*-Gen Amplifikation

Bestandteil	Menge
RedTaq	12,5µl
Primer Ch1	0,5µl
Primer Ch2	0,5µl
Template	2,5µl
ddH ₂ O	9µl

Die PCR-Amplifikation erfolgte unter den in Tabelle 8 angeführten thermozyklischen Bedingungen.

Tabelle 10: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des *omp2*-Gens

Schritt	°C	Dauer in Minuten	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	1 min	40
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Finale Elongation	72°C	7 min	1

Amplifikation des 16SrRNA-Gens von Chlamydien

Zur Klassifizierung der nachgewiesenen Chlamydien wurde eine *Chlamydiales*-spezifische Sequenz des 16S rRNA-Gens amplifiziert und sequenziert.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die 16SrRNA-Gen Amplifikation

Bestandteil	Menge
RedTaq	12,5µl
Primer 16SF	0,5µl
Primer 16SR	0,5µl
Template	2,5µl
ddH ₂ O	9µl

Die PCR-Amplifikation erfolgte unter den in Tabelle 11 angeführten thermozyklischen Bedingungen. Um eine höhere Bindungsspezifität der Primer an das entsprechende Template zu erreichen, handelt sich bei dieser PCR um eine Vorzyklen-*Touch down*-PCR.

Tabelle 12: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des 16SrRNA-Gens von Chlamydien

Schritt	°C	Dauer	Anzahl Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	4 min	1
Denaturierung	94°C	30 sek	5
Annealing	65*°C	24 sek	*: Temperatur wird nach jedem Zyklus um 1°C abgesenkt
Elongation	72°C	1,5 min	
Denaturierung	94°C	30 sek	25
Annealing	59°C	0,4 min	
Elongation	72°C	1,5 min	
Finale Elongation	72°C	7 min	1

3.6.3 Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein 1,5%iges Agarosegel (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) hergestellt. In die Geltaschen wurden je 7 µl des jeweiligen PCR-Produkts pipettiert. In regelmäßigen Abständen wurde eine Geltasche mit 3,5 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Gene Ruler 100 Basenpaare plus DNA ladder, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) befüllt. Danach wurden die geladenen Gele bei einer Spannung von 200 V für 1 h laufen gelassen und anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung (Konzentration 2,5 mg/l) für 20 min gefärbt. Nach Entfärbung der Gele in einem Wasserbad für 10 min wurden die Amplifikationsprodukte mithilfe eines Transluminators (Bio-Rad Laboratories GmbH, Wien, Österreich) unter Verwendung der Software Quantity One sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.6.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur Aufreinigung der PCR-Produkte wurde der *GeneJet PCR Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, Deutschland) verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben. Hierbei wurde zunächst das PCR-Produkt mit DNA-Bindungspuffer im Volumenverhältnis 1:1 gemischt. Anschließend wurde im Verhältnis 1:2 Isopropanol beigemischt. Im nächsten Schritt wurde das Gemisch in eine DNA-Bindungsfiltereinheit überführt und bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurden 700 µl Waschpuffer in die Bindungsfiltereinheit pipettiert und das Röhrchen erneut bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Röhrchen abermals bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert, um mögliche Reste des Waschpuffers endgültig zu entfernen. Danach wurde der DNA-Bindungsfilter in ein neues Röhrchen platziert und 50 µl Elutionspuffer dazu pipettiert und anschließend bei 12.000 x g für 1 min zentrifugiert.

Nach Aufreinigung der PCR-Produkte wurden diese zur Sequenzierung an die Firma LGC Genomics nach Berlin versendet. Die dort generierten Sequenzfolgen wurden nach Übermittlung mit Sequenzeinträgen der *NCBI GenBank*-Datenbank verglichen und dabei Sequenzähnlichkeitswerte berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Bakterien und Pilze

Es konnten von allen Choanentupferproben Bakterien auf den eingesetzten Kulturmedien unter unterschiedlichen Inkubationsbedingungen isoliert werden (100%). In den nachfolgenden Tabellen sind die in den Choanentupfern nachgewiesenen Bakterienarten dargestellt. Die Klassifizierung der nachgewiesenen Bakterienisolate erfolgte massenspektrometrisch. Eine korrekte Speziesidentifizierung wurde durch einen logarithmischen Identifikationswert (Maß für die Übereinstimmung des generierten mit gespeicherten Referenzspektren) von ≥ 2.00 angezeigt. Ein Identifikationsscore von >1.70 bis <2.00 sprach für eine Identifikation auf Gattungsebene. Bei massenspektrometrisch nicht identifizierbaren Bakterienisolaten wurde ein representatives Isolat der 16S rRNA-Gensequenzanalyse unterzogen. Infolge wurde die Gattungs- und Artzugehörigkeit durch Berechnung von Sequenzähnlichkeitswerten bestimmt (Gattungszugehörigkeit: $>97\%$ Sequenzähnlichkeit, Artzugehörigkeit: $>99\%$ Sequenzähnlichkeit).

Die Identifizierung von Pilzisolaten aus Choanen- und Kloakentupferproben erfolgte durch Sequenzanalyse der *Internal-Transcribed-Spacer-Region* mit Berechnung von Sequenzähnlichkeitswerten (Gattungszugehörigkeit: $>97\%$ Sequenzähnlichkeit, Artzugehörigkeit: $>98,5\%$ Sequenzähnlichkeit).

Tabelle 13: Kulturell nachgewiesene Bakterien und Pilze in Choanentupfern (Ch) und Kloakentupfern (Kl) sowie Ergebnisse des PCR-Nachweises von Chlamydien und Mykobakterien

Nr. Ch	Bakterien (Kultur)	Chlamydien (PCR)	Mykobakterien (PCR)	Pilze (Kultur)
1	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Escherichia coli</i>	-	-	-
3	<i>Tsukamurella paurometabola</i> , <i>Escherichia coli</i>	-	-	-
5	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Moraxella osloensis</i>	-	-	-
7	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	-	-	-
9	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Micrococcus luteus</i>	-	-	<i>Hypoxyton</i> sp. ¹⁹
11	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Stenotrophomonas matophila</i>	-	-	-

13	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Morganella morganii</i>	-	-	-
15	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Stenotrophomonas pavanii</i> ¹ , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Dietzia aurantiaca</i>	-	-	-
16	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Raoultella ornithinolytica</i> , <i>Raoultella planticola</i>	-	-	-
17	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Delftia acidovorans</i> ² , <i>Staphylococcus xylosus</i>	-	-	-
19	<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-
21	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Arthrobacter</i> sp	-	-	-
23	<i>Bordetella hinzii</i> , <i>Falsarthrobacter</i> sp. ³	-	-	-
25	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Morganella morganii</i>	-	-	-
27	<i>Bordetella hinzii</i> , <i>Staphylococcus lentus</i> ⁴	-	-	-
29	<i>Bordetella hinzii</i> , <i>Corynebacterium</i> sp. ⁵	-	-	-
31	<i>Staphylococcus equorum</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶ , <i>Bordetella hinzii</i>	-	-	-
33	<i>Arthrobacter</i> sp, <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶ , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Morganella morganii</i>	-	-	<i>Coriolopsis gallica</i> ²⁰
35	<i>Morganella morganii</i> , <i>Falsarthrobacter</i> sp ³ , <i>Salmonella enterica</i>	-	-	-
37	<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-
39	<i>Falsarthrobacter</i> sp ³ , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Morganella morganii</i>	+	-	-
40	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷ ,	+	-	-
42	<i>Citrobacter braakii</i> , <i>Corynebacterium</i> sp. ⁵ , <i>Ponticoccus gilvus</i> ¹¹ , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
44	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	<i>Hypoxyton rubiginosum</i> ²¹
46	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-
48	<i>Micrococcus luteus</i> , <i>Bordetella hinzii</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i>	-	-	-
50	<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-
52	<i>Salmonella enterica</i>	-	-	-
54	<i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
56	<i>Falsarthrobacter</i> sp. ³	-	-	-
58	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-

60	<i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Corynebacterium</i> sp. ⁵	-	-	-
62	<i>Kocuria marina</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
64	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Falsarthrobacter</i> sp. ³ , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
66	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
68	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bordetella hinzii</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
70	<i>Bordetella hinzii</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
72	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Bordetella hinzii</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Acinetobacter guillouiae</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
74	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Arthrobacter</i> sp., <i>Morganella morganii</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-
76	<i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Bacillus mycoides</i>	-	-	-
78	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Bacillus mycoides</i> , <i>Bordetella hinzii</i>	-	-	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i> ²⁷
80	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Sphingobacterium yamdrokense</i> ⁸ , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Bacteroides fragilis</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷	-	-	-
81	<i>Rhizobium radiobacter</i> , <i>Bordetella hinzii</i>	-	-	-
83	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Falsarthrobacter</i> sp. ³	-	-	-
85	<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-
87	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
89	<i>Falsarthrobacter</i> sp. ³ , <i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-
91	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Chryseobacterium gleum</i>	-	-	-
93	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Aeromonas hydrophila</i>	-	-	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> ²²
95	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Serratia marcescens</i> ⁹ , <i>Morganella morganii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
97	<i>Proteus vulgaris</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
99	<i>Morganella morganii</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-
100	<i>Citrobacter braakii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Bordetella trematum</i>	-	-	-
102	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Morganella morganii</i>	-	-	-
104	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	<i>Cladosporium herbarum</i> ²³

106	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
108	<i>Morganella morganii</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Vagococcus fluvialis</i>	-	-	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> ²²
110	<i>Staphylococcus xylosum</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
113	<i>Morganella morganii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	<i>Pithomyces chartarum</i> ²⁴ <i>Aspergillus westerdijkiae</i> ²²
115	<i>Microbacterium liquefaciens</i> , <i>Proteus hauseri</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
116	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Salmonella enterica</i>	-	-	-
117	<i>Morganella morganii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
119	<i>Bordetella trematum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
121	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Salmonella enterica</i>	-	-	-
123	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
125	<i>Bordetella hinzii</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-
127	<i>Morganella morganii</i> , <i>Falsarthrobacter</i> sp. ³	-	-	-
129	<i>Bordetella trematum</i> ¹⁰ , <i>Morganella morganii</i>	-	-	-
131	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	+	-	-
133	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Falsarthrobacter</i> sp. ³ , <i>Morganella morganii</i> ⁷	-	-	-
135	<i>Enterococcus casseliflavus</i> , <i>Arthrobacter creatinolyticus</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	+	-	-
137	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ¹² , <i>Citrobacter braakii</i>	-	-	-
139	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-
141	<i>Morganella morganii</i> , <i>Elizabethkingia miricola</i>	-	-	-
143	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
145	<i>Falsarthrobacter</i> sp. ³ , <i>Elizabethkingia miricola</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	-	-	<i>Stemphylium vesicarium</i> ²⁵
147	<i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Citrobacter braakii</i>	-	-	-
149	<i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Elizabethkingia miricola</i> , <i>Providencia rettgeri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-
151	<i>Pantoea agglomerans</i>	-	-	-
153	<i>Aeromonas hydrophila</i> ¹³	-	-	-

155	<i>Proteus hauseri</i> , <i>Providencia rettgeri</i>	-	+	<i>Sarocladium strictum</i> ²⁶
157	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Escherichia coli</i> ¹⁴ , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	+	-
159	<i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
161	<i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
163	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-
165	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-
167	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-
169	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
171	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-
173	<i>Salmonella enterica</i> ¹⁵	-	-	-
175	<i>Morganella morganii</i> ⁷	-	-	-
177	<i>Staphylococcus sciuri</i>	-	+	-
179	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Escherichia coli</i> ¹⁴	-	-	-
181	<i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶ , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Corynebacterium sp</i> ⁵	-	-	-
183	<i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Enterococcus faecalis</i>	-	-	-
185	<i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Enterococcus faecalis</i> Fehler! Textmarke nicht definiert., <i>Providencia rettgeri</i>	-	+	-
187	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus sciuri</i>	-	-	-
189	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷	-	-	-
191	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
193	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Bacillus toyonensis</i> ¹⁶	-	-	-
195	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Chryseobacterium indologenes</i>	-	+	-
197	<i>Morganella morganii</i> ⁷	-	-	-
199	<i>Staphylococcus sciuri</i> , <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Vagococcus fluvialis</i>	-	-	-
201	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶ , <i>Staphylococcus xylosum</i>	-	-	-
203	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶ , <i>Vagococcus fluvialis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-
205	<i>Comamonas testosteroni</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶	-	-	-
207	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶	-	+	-
209	<i>Acinetobacter tjernbergiae</i>	-	+	-
211	<i>Morganella morganii</i>	-	+	-
213	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-
215	<i>Escherichia coli</i>	-	+	-
217	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	+	-

219	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-
221	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-	+	-
223	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> ⁶	-	-	-
225	<i>Morganella morganii</i>	-	-	-
227	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-
229	<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	-
231	<i>Providencia rettgeri</i> , <i>Morganella morganii</i> ¹⁷	-	+	-
233	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Morganella morganii</i> ⁷ , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Providencia rettgeri</i> ¹⁸ , <i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-
235	<i>Morganella morganii</i>	-	+	-
237	<i>Vagococcus fluvialis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-
239	<i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-
241	<i>Acinetobacter pittii</i>	-	+	-
243	<i>Morganella morganii</i> , <i>Providencia rettgeri</i>	-	-	-
245	<i>Providencia rettgeri</i>	-	+	-
247	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	+	-
249	<i>Morganella morganii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-
Nr. Kl				
65	nicht durchgeführt	-	-	<i>Alternaria alternata</i> ⁴⁰
73	nicht durchgeführt	-	-	<i>Talaromyces purpurogenus</i> ³³
79	nicht durchgeführt	-	-	<i>Cladosporium cladosporioides</i> ³⁹ <i>Alternaria alternata</i> ⁴⁰ <i>Cladosporium herbarum</i> ²³
86	nicht durchgeführt	-	-	<i>Aspergillus westerdijikiae</i> ²²
90	nicht durchgeführt	-	-	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i> ³⁰
96	nicht durchgeführt	-	-	<i>Sarocladium</i> sp. ³⁴
105	nicht durchgeführt	-	-	<i>Penicillium griseofulvum</i> ³⁵
111	nicht durchgeführt	-	-	<i>Aspergillus westerdijikiae</i> ²²
118	nicht durchgeführt	-	-	<i>Stagonosporopsis curcurbitacearum</i> ³²
120	nicht durchgeführt	-	-	<i>Alternaria alternata</i> ³⁶
124	nicht durchgeführt	-	-	<i>Acrostalagmus luteoalbus</i> ³⁸
126	nicht durchgeführt	-	-	<i>Alternaria alternata</i> ⁴⁰
128	nicht durchgeführt	-	-	<i>Chondromyces antarcticum</i> ³⁷
134	nicht durchgeführt	-	-	<i>Penicillium copticola</i> ²⁷

154	nicht durchgeführt	-	-	<i>Scopulariopsis brumptii</i> ²⁸
156	nicht durchgeführt	-	-	<i>Aspergillus restrictus</i> ³¹
192	nicht durchgeführt	-	-	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> ²²
198	nicht durchgeführt	+	-	-
200	nicht durchgeführt	+	-	-
204	nicht durchgeführt	-	-	<i>Penicillium cinnamopurpureum</i> ³⁰
212	nicht durchgeführt	-	-	<i>Trichoderma longibrachiatum</i> ²⁹

Höchste Sequenzähnlichkeitswerte zu ¹*Stenotrophomonas pavanii* (99,72%), ²*Delftia acidovorans* (99,93%), ³*Falsarthrobacter nasiphocae* (97,29%), ⁴*Staphylococcus lentus* (99,93%), ⁵*Corynebacterium hansenii* (97,8%), ⁶*Staphylococcus saprophyticus* ssp. *saprophyticus* (99,93%), ⁷*Morganella morganii* ssp. *morganii* (99,72%), ⁸*Sphingobacterium yamdrokense* (99,72%), ⁹*Serratia marcescens* (99%), ¹⁰*Bordetella trematum* (99,71%), ¹¹*Ponticoccus gilvus* (99,04%), ¹²*Pseudomonas aeruginosa* (99,93%), ¹³*Aeromonas hydrophila* ssp. *hydrophila* (99,86%), ¹⁴*Escherichia coli* (99,4%), ¹⁵*Salmonella enterica* ssp. *diarizonae* (99,56%), ¹⁶*Bacillus toyonensis* (99,85%), ¹⁷*Morganella morganii* ssp. *morganii* (99,15%), ¹⁸*Providencia rettgeri* (99,58%), ¹⁹*Hypoxylon* sp (97%), ²⁰*Corioloropsis gallica* (99,67%), ²¹*Hypoxylon rubiginosum* (99,82%), ²²*Aspergillus westerdijkiae* (99,09%), ²³*Cladosporium herbarum* (99,80%), ²⁴*Pithomyces chartarum* (99,82%), ²⁵*Stemphylium vesicarium* (99,63%), ²⁶*Sarocladium strictum* (99,25%), ²⁷*Penicillium copticola* (100%), ²⁸*Scopulariopsis brumptii* (99,11%), ²⁹*Trichoderma longibrachiatum* (99,83%), ³⁰*Penicillium cinnamopurpureum* (99,81%), ³¹*Aspergillus restrictus* (99,82%), ³²*Stagonosporopsis curcubitacearum* (99,41%), ³³*Talaromyces purpureogenus* (99,63%), ³⁴*Sarocladium* sp. (>97%), ³⁵*Penicillium griseofulvum* (99,61%), ³⁶*Alternaria alternata* (100%), ³⁷*Chondromyces antarcticum* (100%), ³⁸*Acrostalagmus luteoalbus* (99,62%), ³⁹*Cladosporium cladosporioides* (100%), ⁴⁰*Alternaria alternata* (98,60 %)

4.1.1 Salmonellen

Die massenspektrometrisch als *Salmonella enterica* identifizierten Bakterienisolate (n=18) wurden zur Serotypisierung an die AGES Graz versandt und dabei die in Tabelle 14 angeführten *Salmonella enterica*-Unterarten und Serotypen ermittelt.

Tabelle 14: Serotypisierungsergebnisse der *Salmonella*-Isolate

Proben#	<i>Salmonella enterica</i> Unterart	Serotyp Eigenname	Serotyp Antigenformel
1	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	65 : z10 : e,n,x,z15

15	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	6,14 : I,v : z
21	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>houtenae</i>	Tuindorp	43 : z4,z32 : -
35	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	11 : I,v : z
37	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	58 : z52 : z
50	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	60 : k : z53
52	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	50 : k : z
66	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	11 : I,v : z
74	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	57 : k : e,n,x,z15
78	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	47 : z52 : 1,5,7
93	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	11 : I,v : z
95	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	50 : r : z
116	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	47 : z52 : 1,5,7
121	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	47 : z52 : 1,5,7
169	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	43 : z52 : z53
173	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	47 : z52 : 1,5,7

189	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	43 : z52 : z53
195	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>houtenae</i>	Tuindorp	43 : z4,z32 : -
247	<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>diarizonae</i>	-	60 : k : z53

4.1.2. Chlamydien

Es wurden sämtliche Probenutpfer (n=249) auf Chlamydien getestet und dabei 23 Proben durch Einsatz der *Chlamydiales*-spezifischen 16S rRNA-Gen-PCR als positiv ermittelt. Durch Sequenzierung der erhaltenen Amplikons und Sequenzvergleiche mit Einträgen in der *NCBI GenBank*-Datenbank konnten für die Amplifikate der Proben 39Ch, 40Ch, 131Ch, 135Ch, 198Kl und 200Kl ein Sequenzähnlichkeitswert von 99% zu *Chlamydia* sp. H15-1957-10C (Chlamydien-Isolat aus einer Grünen Buschviper) bzw. von 98% zu *Chlamydia pneumoniae* berechnet werden. Aufgrund von Mischamplifikationen konnten bei den verbleibenden 17 Amplikons keine verwertbaren Sequenziererergebnisse erzeugt werden.

4.1.3 Mykobakterien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden auch alle Probenutpfer auf Mykobakterien getestet (n=249). Auch hier konnte durch den Einsatz einer Mykobakterien-spezifischen 16S rRNA-Gen-PCR in den folgenden 21 Choanentupferproben Mykobakterien detektiert werden: 155Ch, 157Ch, 165Ch, 177Ch, 185Ch, 195Ch, 207Ch, 209Ch, 211Ch, 213Ch, 215Ch, 217Ch, 219Ch, 221Ch, 231Ch, 233Ch, 235Ch, 237Ch, 241Ch, 245Ch und 247Ch. Nach Sequenzierung und durch Sequenzvergleichsuntersuchungen konnte für alle Amplifikate ein Sequenzähnlichkeitswert von 99,25% zu *Mycobacterium avium* ermittelt werden.

4.1.4 Mykoplasmen

Es wurden sämtliche Choanentupfer kulturell auf Mykoplasmen untersucht. Dabei konnten aus insgesamt 10 Choanentupfern Mykoplasmen isoliert werden. Alle gewonnenen Mykoplasmenisolate waren massenspektrometrisch nicht identifizierbar. Durch Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens, der 16S-23S intergenischen Spacer-Sequenz und eines *rpoB*-Genfragments konnten die 10 Mykoplasmenisolate keiner bisher beschriebenen Mykoplasmenart zugeordnet werden. Die ermittelten Sequenzähnlichkeitswerte zu bekannten Mykoplasmenarten weisen auf die Zugehörigkeit der 10 Mykoplasmenisolate zu zwei bislang unbeschriebenen Mykoplasmenarten hin (Tabelle 15).

Tabelle 15: Sequenzähnlichkeitswerte gewonnener Mykoplasmenisolate zu nächstverwandten Mykoplasmenarten

Probennummer	Schlangenart	16S rRNA-Gen	16S-23S intergenischer Spacer	<i>rpoB</i> -Gen
93Ch	<i>Naja naja</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i> (94%)	<i>Mycoplasma lipofaciens</i> (87%)	<i>Mycoplasma fermentans</i> (83%)
99Ch	<i>Naja atra</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i> (94%)	<i>Mycoplasma lipofaciens</i> (87%)	<i>Mycoplasma fermentans</i> (83%)
102Ch	<i>Naja atra</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i> (94%)	<i>Mycoplasma lipofaciens</i> (87%)	<i>Mycoplasma fermentans</i> (83%)
116Ch	<i>Naja sputatrix</i>	<i>Mycoplasma fermentans</i> (94%)	<i>Mycoplasma lipofaciens</i> (87%)	<i>Mycoplasma fermentans</i> (83%)
125Ch	<i>Trimeresurus purpureomaculatus</i>	<i>Mycoplasma iguanae</i> (95%)	<i>Mycoplasma iguanae</i> (86%)	<i>Mycoplasma pulmonis</i> (73%)
127Ch	<i>Trimeresurus puniceus</i>	<i>Mycoplasma iguanae</i> (95%)	<i>Mycoplasma iguanae</i> (86%)	<i>Mycoplasma pulmonis</i> (73%)
135Ch	<i>Trimeresurus albolabris</i>	<i>Mycoplasma iguanae</i> (95%)	<i>Mycoplasma iguanae</i> (86%)	<i>Mycoplasma pulmonis</i> (73%)
235Ch	<i>Agkistrodon venezuelaensis</i>	<i>Mycoplasma iguanae</i> (95%)	<i>Mycoplasma iguanae</i> (86%)	<i>Mycoplasma pulmonis</i> (75%)
237Ch	<i>Agkistrodon venezuelaensis</i>	<i>Mycoplasma iguanae</i> (95%)	<i>Mycoplasma iguanae</i> (86%)	<i>Mycoplasma pulmonis</i> (73%)
239Ch	<i>Agkistrodon venezuelaensis</i>	<i>Mycoplasma iguanae</i> (95%)	<i>Mycoplasma iguanae</i> (86%)	<i>Mycoplasma pulmonis</i> (73%)

5. Diskussion

Chlamydia pneumoniae ist ein Infektionserreger der oberen und unteren Atemwege bei Menschen und Tieren (Mitchell et al., 2010). Auch andere Organsysteme wie der Verdauungstrakt können bei Reptilien betroffen sein und beispielsweise in einer nekrotisierenden Enteritis resultieren (Homer et al., 1994). In dieser Arbeit konnten in 6 Tupferproben (Prävalenz 2,4%, vier Choanentupfer, zwei Kloakentupfer) *Chlamydia* sp. mit höchster Sequenzähnlichkeit von 99% zu dem aus einer Grünen Buschvipere isolierten Chlamydienstamm H15-1957-10C und von 98% zu *Chlamydia pneumoniae* nachgewiesen werden. Insgesamt wurden 23 *Chlamydiales*-positive Amplikons (Prävalenz 9,2%) zur Sequenzanalyse eingesandt, bei 17 Proben waren durch Generierung von Amplikongemischen die Sequenzierungsergebnisse jedoch nicht verwertbar. Durch den Einsatz eines generischen, *Chlamydiales*-spezifischen PCR-Systems waren Mischamplifikationen zu erwarten, zumal Schlangen eine Vielzahl von bislang unbeschriebenen Chlamydien-Arten und Chlamydien-ähnliche Mikroorganismen der Ordnung *Chlamydiales* beherbergen können (Soldati et al., 2004, Staub et al., 2018). Alle Tiere mit positivem Chlamydien-Nachweis waren klinisch unauffällig. Dies deckt sich mit einer Untersuchung von 6 Schweizer privaten Schlangenhaltungen, bei der es ebenfalls gelang *Chlamydia pneumoniae* bei klinisch unauffälligen Schlangen sowohl aus Choanen- als auch Kloakentupfern nachzuweisen (Taylor-Brown et al., 2015). Es ist zu erwähnen, dass im Rahmen dieser Arbeit keine Tiere pathologisch untersucht wurden und somit keine Schlussfolgerungen hinsichtlich pathologischer Organveränderungen gezogen werden können. In Anbetracht des Fehlens klinisch sichtbarer Veränderungen bei den untersuchten Schlangen sollte in jedem Fall das Risiko bedacht werden, dass auch klinisch unauffällige Tiere mit *Chlamydia* sp. bzw. *Chlamydia pneumoniae* infiziert oder besiedelt sein können. Nicht nur bei der Umsetzung von Quarantänemaßnahmen, sondern auch bei der Evaluierung eines möglichen Zoonoserisikos, muss auf entsprechende Hygienemaßnahmen geachtet werden, da *Chlamydia pneumoniae* als häufiger Erreger von Pneumonien sowie Bronchitiden bei Menschen bekannt ist (Hahn et al., 2002).

Ob es sich bei den nachgewiesenen Chlamydien um Vertreter einer neuen Art oder um Stammvarianten von *Chlamydia pneumoniae* handelt, konnte im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden. Hierfür sind umfassende Sequenzanalysen von weiteren phylogenetischen

Markergenen oder Gesamtgenomvergleichsstudien notwendig (Sachse et al., 2014). Mittels *omp2*-PCR konnte bei keiner der 249 Proben Chlamydien nachgewiesen werden. Diese negativen Ergebnisse können auf unterschiedliche Ursachen, wie Pipettierfehler bei der Herstellung von PCR-Reaktionsgemischen, mangelnde analytische Spezifität der durchgeführten PCR oder Erregerkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze der *omp2*-PCR zurückzuführen sein. Letzteres erscheint im vorliegenden Fall am wahrscheinlichsten, da von einer geringen Chlamydien-Konzentration in Proben von asymptomatischen Tieren auszugehen ist, Chlamydien in 23 der untersuchten Proben durch Einsatz der höher-sensitiven *Chlamydiales*-spezifischen PCR nachzuweisen waren und Chlamydien bei vorangegangenen, akuten Erkrankungsfällen im Bestand mithilfe der *omp2*-PCR detektiert werden konnten.

Insgesamt wurden von 249 untersuchten Tupferproben, in 21 Choanentupferproben (Prävalenz 8,4%) Mykobakterien mithilfe einer gattungsspezifischen PCR nachgewiesen. In der anschließenden Sequenzanalyse konnte für alle Amplikons ein höchster Sequenzähnlichkeitswert von 99,25% zu *Mycobacterium avium* ermittelt werden. Unterarten von *M. avium* sind unter anderem die Auslöser der Geflügeltuberkulose bei Vögeln und der John'schen Krankheit bei Wiederkäuern (McDiarmid, 1984; Dvorska et al., 2003; Harris und Barletta, 2001). Es handelt sich um eine ubiquitär auftretende Mykobakterienart, die beispielsweise aus Wasser isoliert werden kann (Parker et al., 1983; von Reyn et al., 1993). Es ist somit möglich, dass *Mycobacterium avium* durch Kontamination in dem vorgelegten Fall in die Maulhöhle der Schlangen gelangt. Möglicherweise geschieht dies durch kontaminiertes Wasser bzw. Futter oder durch das Handling mehrerer Schlangen hintereinander ohne korrektes Waschen und Desinfizieren der Hände. Nicht-tuberkulöse Mykobakterien, wie beispielsweise die des *Mycobacterium avium*-Komplexes können granulomatöse Läsionen in der Subcutis von Reptilien auslösen (Reil et al., 2017). Daher ist wie bereits bei den Chlamydien nicht auszuschließen, dass pathologische Veränderungen bereits nachzuweisen wären, diese sich aber noch nicht klinisch manifestiert haben.

Verschiedene Mykoplasmenarten sind bedeutsame Erreger von Atemwegserkrankungen bei Menschen und Tieren (Rosengarten et al., 2001). Auch bei Schlangen konnten bisher vereinzelt nicht näher charakterisierte Mykoplasmen aus oder in entzündlichen Veränderungen des

Respirationstrakts isoliert bzw. nachgewiesen werden (Penner et al., 1997; Schmidt et al., 2013; Marschang et al., 2016). In der vorliegenden Studie war die Isolierung von Mykoplasmen aus insgesamt 10 Choanentupferproben erfolgreich. Anschließend phylogenetische Untersuchungen wiesen eindeutig darauf hin, dass es sich bei den nachgewiesenen Erregerisolaten um Vertreter zweier bislang unbeschriebener Mykoplasmenarten handelt. Während die von Echten Kobra (*Naja*)-Arten isolierten Mykoplasmen dem phylogenetischen *M. bovis*-Cluster zugeordnet werden konnten, zeigten die Mykoplasmenisolate aus Grubenottern (*Agkistrodon*, *Trimeresurus*) nähere Verwandtschaft mit Vertretern des phylogenetischen *M. hyopneumoniae*-Clusters (Voloikhov et al., 2012). Da es sich bei dem vorliegenden Mykoplasmenachweis um eine Erstisolierung zweier unbekannter Mykoplasmenarten handelt, ist die veterinärmedizinische Bedeutung der nachgewiesenen Mykoplasmen völlig unbekannt. Ihre nahe Verwandtschaft zu bekannten Mykoplasmenarten, die bei Tieren schwere Erkrankungen der Atmungsorgane hervorrufen können (*M. bovis*, *M. hyopneumoniae*, *M. pulmonis*), könnte jedoch auf Erregerfähigkeiten, auch bei Giftschlangen Atemwegserkrankungen auszulösen, hinweisen.

Neben Chlamydien, Mykoplasmen und Mykobakterien konnten in den 128 Choanentupferproben diverse weitere Bakterienarten nachgewiesen werden. Die Tiere zeigten keine klinischen Auffälligkeiten. Daher sind die nachgewiesenen Mikroorganismen möglicherweise der physiologischen oralen Mikrobiota bei Giftschlangen zuordenbar. Zu den am häufigsten nachgewiesenen Arten im Rahmen dieser Arbeit gehören *Staphylococcus xylosum* (n=32), *Salmonella enterica* (n=21), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=22), *Enterococcus faecalis* (n=25), *Morganella morganii* (n=40), *Staphylococcus sciuri* (n=18), *Providencia rettgeri* (n=20), *Bordetella hinzii* (n=11), *Falsarthrobacter* sp. (n=10) und *Citrobacter freundii* (n=10). *Providencia* sp. wurde bereits 1980 aus Maulhöhlen von in menschlicher Obhut lebenden Schlangen isoliert (Arroyo et al. 1980). Jorge et al. (1990) konnten bei *Bothrops jararaca* in der Maulhöhle verschiedene Bakterien wie zum Beispiel *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp., *Providencia rettgeri* und *Clostridium* sp. nachweisen. Klapperschlangen wiesen als Hauptkomponenten der oralen Mikrobiota *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*, *Enterobacter cloacae* und *Pseudomonas aeruginosa* auf (Ferreira et al., 2009). Bei der Beprobung von 75 bakteriellen Infektionen nach

Schlangenbissen in Costa Rica waren die häufigsten nachweisbaren Mikroorganismen *Morganella morganii*, *Aeromonas hydrophila* und *Providencia rettgeri* (Brenes-Chacón et al., 2019). Wird der Vergleich dieser Studien mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen gestellt, lässt sich feststellen, dass es sich insgesamt meist um die gleichen Bakterienarten handelt. Der Unterschied liegt in der Häufigkeit ihres Auftretens bei den Beprobungen der verschiedenen Studien. Dies könnte mehrere zugrundeliegende Ursachen haben. Unter anderem spielt die fäkale Keimflora der Futtertiere in der Zusammensetzung der Keimbeseidlung der Maulhöhle der Schlangen eine Rolle (Garg et al., 2009). Weiters sind bei in menschlicher Obhut gehaltenen Tieren die Haltungsbedingungen immer bei der Interpretation der Ergebnisse miteinzubeziehen. Immunsuppression ist unter anderem oft der Grund für eine bakterielle Infektion. Diese kann zum Beispiel durch inadäquate Luftfeuchtigkeit, Temperatur und auch mangelnde Hygiene bedingt sein (Chinnadurai und Devoe, 2009). Diese inadäquaten Bedingungen ermöglichen fakultativ pathogenen Erreger ursächlich für Erkrankungen verantwortlich zu sein (Sonntag et al., 2021).

Ein Beispiel dafür, dass Opportunisten unter Umständen Erkrankungen auslösen können, ist der bereits beschriebene Fallbericht über eine *Naja naja atra*, die aufgrund einer *Morganella morganii*-Infektion verstarb (Wang et al., 2017). Aus dem Bericht gehen die genauen Haltungsbedingungen der Schlange nicht hervor, weshalb eine vorausgegangene Immunsuppression nicht auszuschließen ist. Der Nachweis von *Morganella morganii* in der hier vorliegenden Studie konnte zum Vergleich mit dem zuvor erwähnten Fallbericht zwar mit keiner klinisch apparenten Auffälligkeit der Tiere durch eine äußerliche Untersuchung in Verbindung gebracht werden, jedoch ist hervorzuheben, dass es in dieser Studie zu keiner pathologischen Untersuchung der Tiere gekommen ist. Dies schließt somit eine innerliche Organveränderung nicht aus.

Bordetella hinzii konnte in 11 Choanentupferproben nachgewiesen werden. Der Nachweis dieser Spezies gelingt häufig bei Schlangen (Schmidt et al., 2013). Neben dem Nachweis bei Schlangen mit respiratorischen Krankheitssymptomen konnte *Bordetella hinzii* auch bei klinisch unauffälligen Tieren gefunden werden. Die Pathogenität des Erregers ist somit nicht vollständig geklärt (Plenz et al., 2015). Bei Menschen geht man davon aus, dass es sich um einen fakultativ pathogenen Krankheitserreger handelt (Donato et al., 2005). Ebenfalls konnte *Bordetella trematum* bei unserer Beprobung nachgewiesen werden. Das Bakterium wurde bei

Menschen bereits aus polymikrobiellen Infektionsprozessen isoliert, wie zum Beispiel chronischen Ulzera und Wunden mit verminderter Perfusion und Nekrose. Dem ist jedoch hinzuzufügen, dass die klinische Signifikanz der Spezies bis dato unklar ist (Daxboeck et al., 2004; Almagro-Molto et al., 2015, Almuzara et al., 2015). Aufgrund dieser nicht vollständig geklärten klinischen Relevanz bei beiden Bakterienspezies, ist die Bedeutung des Nachweises, unter anderem in Hinblick auf ein zoonotisches Potential, für den Menschen schwer einschätzbar. Sowohl bei Menschen als auch bei Reptilien besteht hier vermutlich noch weiterer Forschungsbedarf.

Insgesamt konnten in 18 Choanentupferproben Salmonellen nachgewiesen werden. Sechzehn Proben (Prävalenz 12,5%) wiesen *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae* auf, 2 weitere (Prävalenz 1,56%) *Salmonella enterica* ssp. *houtenae* Serovar Tuindorp. Es ist bekannt, dass Salmonellen Teil des Mikrobioms des Verdauungstraktes vieler Reptilienarten sind (Burnham et al., 1998; Madsen et al., 1998; Pedersen et al., 2008). Die 18 positiven Nachweise aus Choanentupferproben sprechen möglicherweise für eine fäkal-orale Kontamination. Es ist anzunehmen, dass die Tiere durch Verunreinigungen im Terrarium bei der Futter- oder Wasseraufnahme mit ihren eigenen oder von Partnertieren ausgeschiedenen, Salmonellen beinhaltenden Faeces in Kontakt kommen, wodurch der Nachweis in der Maulhöhle möglich wird. Zudem ist die Kontamination der Maulhöhle mit Salmonellen durch Futtertiere selbst in Erwägung zu ziehen. Weiters besteht die Möglichkeit einer konstanten Besiedelung mit Salmonellen, was heißt, dass Salmonellen ein Bestandteil des physiologischen Mikrobioms sind, wie es auch in Studien über verschiedene Klapperschlangenarten beschrieben wird (Ferreira et al., 2009).

Die Ausscheidung von Salmonellen erfolgt intermittierend, somit müssen betroffene Tiere nicht zwangsweise auch beim Zeitpunkt der Probennahme Salmonellen ausscheiden (Burnham et al., 1998), weshalb nicht auszuschließen ist, dass die Anzahl der betroffenen Schlangen höher ist als die in dieser Arbeit positiv beprobten Tiere.

Es konnte sowohl für *Salmonella* ssp. *diarizonae* als auch für *Salmonella enterica* ssp. *houtenae* ein zoonotisches Potential nachgewiesen werden (Schneider et al., 2009; Bertrand et al., 2008). Aufgrund dieses zoonotischen Potentials sind bei engem Kontakt mit den Tieren stets

Hygienemaßnahmen zu beachten. Dies gilt insbesondere für Risikogruppen wie zum Beispiel Kinder oder immunsupprimierte Menschen.

Aus 10 Choanentupferproben konnten 9 und aus 19 Kloakentupferproben 15 verschiedene Pilzarten isoliert werden. Die nachgewiesenen Pilzisolatarten waren *Alternaria alternata* (n=4), *Talaromyces purpurogenus* (n=1), *Cladosporium cladosporioides* (n=1), *Cladosporium herbarum* (n=1), *Aspergillus westerdijkiae* (n=3), *Penicillium cinnamopurpureum* (n=2), *Sacroladium sp.* (n=1), *Penicillium griseofulvum* (n=1), *Penicillium copticola* (n=1), *Stagonosporopsis curcurbitacearum* (n=1), *Scopulariopsis brumptii* (n=1), *Acrostalagmus luteoalbus* (n=1), *Chondromyces antarcticum* (n=1), *Aspergillus restrictus* (n=1) und *Trichoderma longibrachiatum* (n=1). Wie bereits erwähnt, wiesen die Tiere keine klinischen Auffälligkeiten auf. Hier ist abermals davon auszugehen, dass es sich bei den nachgewiesenen Pilzen um Komponenten der physiologischen Keimflora sowohl des Rachens als auch der Kloake handelt. Weiters könnte es sich bei den nachgewiesenen Pilzen auch um Umweltkontaminanten handeln, die beispielsweise durch Einbringen von Substraten, über Futtertiere oder durch eine unzureichende Hygienepraxis in die Terrarien eingetragen wurden. Viele der isolierten Pilzspezies konnten bereits bei Reptilien, unter anderem Schlangen, nachgewiesen werden (Rosenthal und Mader, 1996; Nichols et al., 1999; Cheatwood et al., 2003). Sie sind als physiologischer Bestandteil des gastrointestinalen Mikrobioms beschrieben, besitzen aber das Potential als Krankheitserreger bei suboptimalen Haltungsbedingungen zu fungieren (Jacobson, 1980; Hernandez-Divers, 2001; Miller et al., 2004; Orós et al., 2004). Auch hier sei das zoonotische Potential nicht zu vernachlässigen, da beispielsweise *Aspergillus* spp. invasive Aspergillosen bei immunsupprimierten Menschen verursachen können (Bernardeschi et al., 2015).

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, Chlamydien sowie andere potenzielle respiratorische Infektionserreger (Pathobionten) in einem Schlangenbestand (Familie *Viperidae*) mit vorangegangenen Chlamydien-assoziierten Atemwegserkrankungen in Choanen- und Kloakentupferproben nachzuweisen. Es war hierbei von besonderem Interesse, asymptomatische Trägertiere zu identifizieren, um infolge durch entsprechende Maßnahmen eine weitere Erregerausbreitung im Bestand zu verhindern und dabei mögliche Infektketten zu durchbrechen. Der Erregernachweis erfolgte durch Kultivierung mit anschließender massenspektrometrischer Identifikation der Erregerisolate mittels MALDI-TOF. Die massenspektrometrisch nicht identifizierbaren Bakterienisolate wurden durch Analysen des 16S rRNA-Gens (Bakterien, Mykoplasmen), der 16S-23S intergenischen Spacersequenz (Mykoplasmen) und eines *rpoB*-Genfragments (Mykoplasmen) taxonomisch eingeordnet. Die Identifizierung der nachgewiesenen Pilzisolate erfolgte ausschließlich über Analyse der ITS1-5.8 rRNA-ITS2-Sequenzen. Chlamydien und Mykobakterien wurden durch den Einsatz von generischen PCR-Systemen nachgewiesen und anschließend durch Amplikonsequenzierung klassifiziert.

Da die untersuchten Schlangen zum Zeitpunkt der Beprobung keine klinischen Symptome aufwiesen, können die nachgewiesenen Mikroorganismen als Komponenten der autochthonen Mikrobiota bei Giftschlangen angesehen werden. Einige der nachgewiesenen Bakterienarten sind jedoch auch als opportunistische Erreger von Atemwegserkrankungen bei Schlangen bekannt. Zu den am häufigsten nachgewiesenen Bakterien gehörten *Staphylococcus xylosum* (n=32), *Salmonella enterica* (n=18), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=22), *Enterococcus faecalis* (n=25), *Morganella morganii* (n=40), *Staphylococcus sciuri* (n=18), *Providencia rettgeri* (n=20), *Bordetella hinzii* (n=11), *Falsarthrobacter sp.* (n=10) und *Citrobacter freundii* (n=10). Häufiger nachgewiesene Pilze waren *Alternaria alternata* (n=4), und *Aspergillus westerdijkiae* (n=3). Zudem gelang der molekulargenetische Nachweis von Chlamydien (n=23) und *Mycobacterium avium* (n=21) sowie der kulturelle Nachweis von zwei bislang unbeschriebenen Mykoplasmenarten (n=10). Zusammenfassend konnten durch die Anwendung mikrobiologisch-diagnostischer Standardverfahren asymptomatische Trägertiere von Chlamydien und weiteren potenziellen

respiratorischen Infektionserregern im Schlangenbestand identifiziert werden. Außerdem lieferte die Arbeit einen Überblick über die natürlich auftretenden Mikrobiota in Choane und Kloake bei Giftschlangen aus der Familie *Viperidae*. Der Nachweis von nicht-klassifizierbaren Erregern schuf außerdem eine Basis für weitere Untersuchungen, die zur Beschreibung neuer mikrobieller Taxa führen könnten.

7. Summary

This diploma thesis aimed at detecting chlamydia and other respiratory pathobionts in choanal and cloacal swab samples taken from individuals of a snake collection (family *Viperidae*) with a history of chlamydia-associated respiratory disease. It was of particular interest to identify asymptomatic carrier animals and in consequence, to apply appropriate measures in preventing further spread of the pathogens and to interrupt possible chains of infection.

Bacteria and fungi were isolated from swab samples by cultivation and bacterial isolates were identified using MALDI-TOF. Bacterial isolates unidentifiable to the species level by mass spectrometry were submitted to 16S rRNA gene (bacteria, mycoplasmas), 16S-23S intergenic spacer (mycoplasma), and partial *rpoB* (mycoplasmas) sequence analyses. Fungal isolates were identified by sequencing the ITS1-5.8 rRNA-ITS2 spacer region. Chlamydia and mycobacteria were detected by employing generic PCR systems and subsequently classified by amplicon sequencing.

Since the snakes examined did not exhibit clinical symptoms at the time of sampling, the microorganisms detected may be considered as components of the autochthonous microbiota in venomous snakes. However, some of the isolated bacterial species are known opportunistic pathogens that may cause respiratory disease in snakes under certain circumstances. The most frequently isolated bacteria were *Staphylococcus xylosum* (n=32), *Salmonella enterica* (n=18), *Stenotrophomonas maltophilia* (n=8), *Pseudomonas aeruginosa* (n=22), *Enterococcus faecalis* (n=25), *Morganella morganii* (n=40), *Staphylococcus sciuri* (n=18), *Providencia rettgeri* (n=20), *Bordetella hinzii* (n=11), *Falsarthrobacter* sp. (n=10), and *Citrobacter freundii* (n=10). More commonly isolated fungi were *Alternaria alternata* (n=4) and *Aspergillus westerdijkiae* (n=3). In addition, chlamydia and *Mycobacterium avium* were detected by PCR in 23 and 21 swab samples, respectively, and two undescribed *Mycoplasma* species were isolated from 10 choanal swabs.

In summary, by applying standard microbiological procedures asymptomatic animals that carried chlamydia and other respiratory pathobionts were identified in the snake collection. Furthermore, the study results provide an overview of the autochthonous microbiota residing in the choana and cloaca of venomous snakes (family *Viperidae*), and the detection of

unclassifiable bacteria creates a basis for further studies that could lead to the description of new microbial taxa.

8. Literaturverzeichnis

- Abbas, M.D., Marschang, R.E., Schmidt, V., Kasper, A., Papp, T. 2011. A unique novel reptilian paramyxovirus, four adenovirus types and a reovirus identified in a concurrent infection of a corn snake (*Pantherophis guttatus*) collection in Germany. *Vet. Microbiol.* 150: 70-79.
- Abudurexiti, A., Adkins, S., Alioto, D., Alkhovsky, S.V., Avsic-Zupanc, T., Ballinger, M.J., Bente, D.A., Beer, M., Bergeron, E., Blair, C.D. 2020. Taxonomy of the order *Bunyavirales*: Update 2019. *Arch. Virol.* 164: 1949–1965.
- Adesiyun, A.A., Caesar, K., Inder, L. 1998. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* species in animals at Emperor Valley Zoo Trinidad. *J. Zoo. Wildl. Med.* 29: 237–239.
- Ahne, W., Thomsen, I., Winton, J. 1987. Isolation of a reovirus from the snake *Python regius*. *Arch. Virol.* 94: 135–139.
- Allender, M.C., Dreslik, M., Wylie, S., Phillips, C.A., Wylie, D.B., Maddox, C., Delaney, M.A., Kinsel, M.J. 2011. *Chrysosporium* sp. infection in eastern massasauga rattlesnakes. *Emerg. Infect. Dis.* 17: 2383–2384.
- Almagro-Molto, M., Eder, W., Schubert, S. 2015. *Bordetella trematum* in chronic ulcers: report on two cases and review of the literature. *Infect.* 43: 489–494.
- Almuzara, M., Barberis, C., Traglia, G., Sly, G., Procopio, A., Vilches, V., Ramirez, M., Famiglietti, A., Vay, C. 2015. Isolation of *Bordetella* species from unusual infection sites. *JMM Case Rep.* 2, e000029.
- Amarasinghe, G.K., Ayllón, M.A., Bào, Y. 2019. Taxonomy of the order *Mononegavirales*: update. *Arch. Virol.* 164: 1967–1980.

- Amann, R., Springer, N., Schönhuber, W., Ludwig, W., Schmid, E.N., Müller, K.D., Michel, R. 1997. Obligat intracellular bacterial parasites of acanthamoebae related to *Chlamydia* spp. *Appl. Environ. Microb.* 63: 115–121.
- Arroyo, O., Bolaños, R., Muñoz, G. 1980. The bacterial flora of venoms and mouth cavities of Costa Rican snakes. *B. PAHO.* 14: 280–285.
- Barrow, J., Stockton, J.J. 1960. The influences of temperature on the host parasite relationships of several species of snakes infected with *Entamoeba invadens*. *J. Protozool.* 7: 377-383.
- Beck, W., Pantchev, N. 2013. Parasitosen bei Reptilien (Schlangen, Schildkröten, Echsen). *Praktische Parasitologie bei Heimtieren: Kleinsäuger-Vögel-Reptilien-Bienen, Zweite Auflage.* Schülersche, Hannover, Germany, pp. 283-339.
- Bernardeschi, C., Foulet, F., Ingen-Housz-Oro, S., Ortonne, N., Sitbon, K., Quereux, G., Lortholary, O., Chosidow, O., Bretagne, S. 2015. Cutaneous Invasive Aspergillosis: Retrospective Multicenter Study of the French Invasive-Aspergillosis Registry and literature review. *Medicine (Baltimore)* 94, e1018.
- Bertrand, S., Rimhanen-Finne R., Weill F.X., Rabsch, W., Thornton, L., Perevoscikovs, J., van Pelt, W., Heck, M., 2008. Salmonella infections associated with reptiles: the current situation in Europe. *Euro. Surveill.* 13: 24.
- Bodetti, T.C., Jacobson, E., Wan, C., Hafner, L., Pospischil, A., Rose, K., Timms, P. 2002. Molecular Evidence to Support the Expansion of the Hostrange of *Chlamydophila pneumoniae* to Include Reptiles as Well as Humans, Horses, Koalas and Amphibians. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 146–152.
- Brenes-Chacón, H., Ulloa-Gutierrez, R., Soriano-Fallas, A., Camacho-Badilla, K., Valverde-Muñoz, K., Ávila-Agüero, M.L. 2019. Bacterial Infections Associated with *Viperidae*

Snakebites in Children: A 14-Year Experience at the Hospital Nacional de Niños de Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 100: 1227–1229.

Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. *J. Clin. Microbiol.* 38: 2465–2467.

Brown, D.R., Demcovitz, D.L., Plourdé, D.R., Potter, S.M., Hunt, M.E., Jones, R.D., Rotstein, D.S. 2006. *Mycoplasma iguanae* sp. nov., from a green iguana (*Iguana iguana*) with vertebral disease. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 56: 761–764.

Brown, D.R., Wendland, L.D., Rotstein, D.S. 2007. Mycoplasmosis in green iguanas (*Iguana iguana*). *J. Zoo Wildlife Med.* 38: 348–351.

Burnham, B.R., Atchley, D.H., Defusco, R.P., Ferris, K.E., Zicarelli, J.C., Lee, J.H., Angulo, F.J. 1998. Prevalence of fecal shedding of *Salmonella* organisms among captive green iguanas and potential public health implications. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 213: 48–52.

Chang L., Jacobson E.R. 2010. Inclusion body disease, a worldwide infectious disease of boid snakes: a review: *J. Exot. Pet Med.* 19: 216–225.

Chappell, J.D., Duncan, R., Mertens, P.P.C., Dermody, T.S. Orthoreovirus. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. 2005. *Virus Taxonomy, Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press. pp. 455–465.

Cheatwood, J.L., Jacobson, E.R., May, P.G., Farrell, T.M., Homer, B.L., Samuelson, D.A., Kimbrough, J.W. 2003. An outbreak of fungal dermatitis and stomatitis in a free-ranging population of pigmy rattlesnakes (*Sistrurus miliarius barbouri*) in Florida. *J. Wildlife Dis.* 39: 329–337.

- Chen, C.Y., Chen, W.C., Chin, S.C., Lai, Y.H., Tung, K.C., Chiou, C.S. 2010. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *salmonellae* isolates from reptiles in Taiwan. *J. Vet. Diagn. Invest.* 22: 44–50.
- Chinchar, V.G., Hyatt, A., Miyazaki, T., Williams, T. 2009. *Iridoviridae*: poor viral relations no longer. *Microbiol. Immunolog.* 328: 123-170.
- Chinnadurai, S.K., Devoe, R.S. 2009. Selected infectious diseases of reptiles. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 12: 583–596.
- Chua, P.K., Corkill, J.E., Hooi, P.S., Cheng, S.C., Winstanley, C., Hart, C.A. 2005. Isolation of *Waddlia malaysiensis*, a novel intracellular bacterium, from fruit bat (*Eonycteris spelaea*). *Emerg. Infect. Dis.* 11: 271–277.
- Clark, R.W., Marchand, M.N., Clifford, B.J., Stechert, R., Stephens, S., 2011. Decline of an isolated timber rattlesnake (*Crotalus horridus*) population: Interactions between climate change, disease, and loss of genetic diversity. *Biol. Conserv.* 144: 886–891.
- Collingro, A., Toenshoff, E.R., Taylor, M.W., Fritsche T.R., Wagner, M., Horn, M., 2005. ‘*Candidatus Protochlamydia amoebophila*’, an endosymbiont of *Acanthamoeba* spp. *Int. J. Syst. Evol. Micr.* 55: 1863–1866.
- Corsaro, D., Thomas, V., Goy, G., Venditti, D., Radek, R., Greub, G. 2007. ‘*Candidatus Rhabdochlamydia crassificans*’, an intracellular bacterial pathogen of the cockroach *Blatta orientalis* (*Insecta: Blattodea*). *Syst. Appl. Microbiol.* 30: 221–228.
- Corsaro, D., Muller, K.D., Wingender, J., Michel, R. 2013. ‘*Candidatus Mesochlamydia elodeae*’ (*Chlamydiae: Parachlamydiaceae*), a novel chlamydia parasite of free-living amoebae. *Parasitol. Res.* 112: 829–838.
- Cryan, P.M., Meteyer, C.U., Boyles, J.G., Blehert, D.S. 2010. Wing pathology of white-nose syndrome in bats suggests lifethreatening disruption of physiology. *BMC Biol.* 8: 135.

- Daxboeck, F., Goerzer, E., Apfalter, P., Nehr, M., Krause, R. 2004. Isolation of *Bordetella trematum* from a diabetic leg ulcer. *Diabet. Med.* 21: 1247–1248.
- De Sousa, M.A., Weigl, D.R. 1976. The viral nature of Toddia França 1912. *Mem. I. Oswaldo Cruz.* 74: 213–230.
- Donato, G.M., Hsia, H.-L.J., Green, C.S., Hewlett, E.L. 2005. Adenylate cyclase toxin (ACT) from *Bordetella hinzii*: characterization and differences from ACT of *Bordetella pertussis*. *J. Bact.* 187: 7579–7588.
- Draper, C.S., Walker, R., D., Lawler, H., E. 1981. Patterns of oral bacterial infection in captive snakes. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 179: 1223–1226.
- Driggers, T. 2000. Respiratory diseases, diagnostics, and therapy in snakes. *Vet. Clin. North Am. Exot. Anim. Pract.* 3: 519-530
- Dvorska, L., Bull, T.J., Bartos, M., Matlova, L., Svastova, P., Weston, R.T., Kintr, J., Parmova, I., Van Soelingen, D., Pavlik, I. 2003. A standardised restriction fragment length polymorphism (RFLP) method for typing *Mycobacterium avium* isolates links IS901 with virulence for birds. *J. Microbiol. Meth.* 55: 11–27.
- Ebani, V.V., Fratini, F., Bertelloni, F., Cerri, D., Tortoli, E. 2012. Isolation and identification of mycobacteria from captive reptiles. *Res. Vet. Sci.* 93: 1136–1138.
- Everett, K.D., Hornung, L.J., Andersen, A.A. 1999. Rapid detection of the *Chlamydiaceae* and other families in the order *Chlamydiales*: three PCR tests. *J. Clin. Microbiol.* 37: 575–580.
- Everett, K.D. 2000. Chlamydia and Chlamydiales: more than meets the eye. *Vet. Microbiol.*, 75: 109-126.

- Everett, K.D., Thao, M., Horn, M., Dyszynski, G.E., Baumann, P. 2005. Novel chlamydiae in whiteflies and scale insects: endosymbionts '*Candidatus Fritschea bemisiae*' strain Falk and '*Candidatus Fritschea eriococci*' strain Elm. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1581–1587.
- Fayer, R. 1997. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Boca Raton, Florida, USA: CRC Press; pp. 1–251.
- Fehr, A., Walther, E., Schmidt-Posthaus, H., Nufer, L., Wilson, A., Svercel, M., Richter, D., Seghner, H., Pospischil, A., Vaughan, L. 2013. *Candidatus* *Syngnamydia venezia*, a novel member of the phylum *Chlamydiae* from the broad nosed pipefish, *Syngnathus typhle*. *PLOS One*. 8, e70853.
- Feller, M., Huwiler, K., Stephan, R., Altpeter, E., Shang, A., Furrer, H., Pfyffer, G.E., Jemmi, T., Baumgartner, A., Egger, M. 2007. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* 7: 607–613.
- Ferreira Junior, R. S., Siqueira, A. K., Campagner, M. V., Salerno, T., Soares, T., Lucheis, S., Paes, A., Barraviera, B. 2009. Comparison of wildlife and captivity rattlesnakes (*Crotalus durissus terrificus*) microbiota. *Pesquisa Vet. Brasil.* 29: 999–1003.
- Ferrer, C., Colom, F., Frasés, S., Mulet, E., Abad, J.L., Alió, J.L. 2001. Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. *J. Clin. Microbiol.* 39: 2873–2879.
- Fisher, M., C., Henk, D., A., Briggs, C., J., Brownstein, J., S., Madoff, L., C., McCraw, S., L., Gurr, S., J. 2012. Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484: 186–94.
- Frank, W. 1985. Infektion (Invasionen) mit Parasiten (Parasitosen). *Heimtierkrankheiten*. Ulmer, Stuttgart. pp. 226–320.

- Franklinos, H.V., Lorch, J.M., Bohuski, E., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Wright, O.N., Fitzpatrick, L., Petrovan, S., Durrant, C., Linton, C., Baláz, V., Cunningham, A.A., Lawson, B. 2017. Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophiodiicola* in wild European snakes. *Nature Sci. Rep.* 7: 3844.
- Frutos, M.C., Monetti, M.S., Ré, V.E., Cuffini, C.G. 2014. Molecular evidence of *Chlamydomphila pneumoniae* infection in reptiles in Argentina. *Revista Argent. Microbiol.* 46: 45–48.
- Gál, J., Mándoki, M., Rusvai, M., Tavasi, J., Farkas, S. 2009. Reovirus related pathological lesions and consequential death in rough green snake (*Opheodrys aestivus*). *Proc. Int. Congr. Vet. Virol. Bud. Hung.* p. 228.
- Garg, A., Sujatha, S., Garg, J., Acharya, N.S., Parija, S.C. 2009. Wound infections secondary to snakebite. *J. Infect. Dev. Countr.* 3: 221-223.
- Garner, M.M., Wellehan, J.F.X., Nordhausen, R.W, Barr, B. 2008. Characterization of enteric infections associated with two novel atadenoviruses in colubrid snakes. *J. Herpetol. Med. Surg.* 18, 86-94.
- Geue, L., and Löschner, U. 2002. *Salmonella enterica* in reptiles of German and Austrian origin. *Vet. Microbiol.* 84: 79–91.
- Gilson, T., Blanchette, P., Ballmann, M.Z., Papp, T., Pénczes, J.J., Benkő, M., Harrach, B., Branton, P.E. 2016. Using the E4orf6-based E3 ubiquitin ligase as a tool to analyze the evolution of adenoviruses. *J. Virol.* 90: 7350-7367.
- Goldstein, E.J., Agyare, E.O., Vagvolgyi, A.E., Halpern, M. 1981. Aerobic bacterial oral flora of garter snakes: development of normal flora and pathogenic potential for snakes and humans. *J. Clin. Microbiol.* 13: 954–956

Hahn, D.L., Azenabor, A.A., Beatty, W.L., Byrne, G.I. 2002. *Chlamydia pneumoniae* as a respiratory pathogen. *Front. Biosci.* 7, e66–76.

Hallinger, M.J., Taubert, A., Hermosilla, C. 2020. Occurrence of *Kalicephalus*, *Strongyloides*, and *Rhabdias* nematodes as most common gastrointestinal parasites in captive snakes of German households and zoological gardens. *Parasitol. Res.* 119: 947–956.

Harrach, B., Tarján, Z.L., Benkő, M. 2019. Adenoviruses across the animal kingdom: a walk in the zoo. *FEBS Lett.* 593: 3660–3673.

Harris, N.B., Barletta, R.G. 2001. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in veterinary medicine. *Clin. Microbiol. Rev.* 14: 489–512.

Hartley, J.C. Kaye, S., Stevenson, S. Bennett, J., Ridgway, G. 2001. PCR Detection and Molecular Identification of *Chlamydiaceae* Species. *J. Clin. Microbiol.* 39: 3072-3079.

Heldstab, A., Bestetti, G. 1984. Virus associated gastrointestinal diseases in snakes. *J. Zoo. Anim. Med.* 15: 118-128.

Hepojoki J., Hepojoki S., Smura T., Szirovicza L., Dervas E., Prahauer B., Nufer L., Schraner E.M., Vapalahti O., Kipar A., Hetzel, U. 2018. Characterization of Haartman Institute snake virus-1 (HISV-1) and HISV-like viruses-The representatives of genus *Hartmanivirus*, family *Arenaviridae*. *PLoS Pathog.* 14, e1007415.

Hepojoki J., Salmenpera P., Sironen T., Hetzel U., Korzyukov Y., Kipar, A., Vapalahti O. 2015. Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. *J. Virol.* 89: 8657–8660.

Hernandez-Divers, S.J. 2001: Pulmonary candidiasis caused by *Candida albicans* in a Greek tortoise (*Testudo graeca*) and treatment with intrapulmonary Amphotericin B. *J. Zoo Wildl. Med.* 32: 352-359.

- Homer, B. L., Jacobson, E. R., Schumacher, J., Scherba, G. 1994. Chlamydiosis in mariculture-reared green sea turtles (*Chelonia mydas*). *Vet. Path.* 31: 1–7.
- Horn, M., Wagner, M., Müller, K.D., Schmid, E.N., Fritsche, T.R., Schleifer K.-H., Michel, R. 2000. *Neochlamydia hartmannellae* gen. nov., sp. nov. (*Parachlamydiaceae*), an endoparasite of the amoeba *Hartmannella vermiformis*. *Microbiol.*, 146: 1231–1239.
- Huchzermeyer F.W., Langelet E., Putterill J.F. 2008. An outbreak of chlamydiosis in farmed Indioacific crocodiles (*Crocodylus porosus*). *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 79: 99–100.
- Hyatt, A.D., Williamson, M., Coupar, B.E., Middleton, D., Hengstberger, S.G., Gould, A.R., Elleck, P.S., Wise, T.G., Kattenbelt, J., Cunningham, A.A., Lee, J. 2002. First identification of a ranavirus from green pythons (*Chondropython viridis*). *J. Wildlife Dis.* 38: 239-252.
- Hyndman T.H., Shilton C.M., Marschang R.E. 2013. Paramyxoviruses in reptiles: a review. *Vet. Microbiol.* 165: 200–213.
- Jacobson, E.R., Gaskin, J.M., Mansell, J. 1989. Chlamydial infection in puff adders, *Bitis arietans*. *J. Zoo. Wildl. Med.* 20: 364–369.
- Jacobson, E.R. 1980. Necrotizing mycotic dermatitis in snakes: clinical and pathologic features. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177: 838-841.
- Jacobson, E.R. 2007. *Infectious Diseases and Pathology of Reptiles* CRC Press, Boca Raton
- Jacobson, E.R., Brown, M.B., Wendland, L.D., Brown, D.R., Klein, P.A., Christopher, M.M., Berry, K.H. 2014. Mycoplasmosis and upper respiratory tract disease of tortoises: a review and update. *Vet. J.* 201: 257–264.
- Jacobson, E.R., Heard, D., Andersen, A. 2004. Identification of *Chlamydophila pneumoniae* in an emerald tree boa, *Corallus caninus*. *J. Vet. Diagn. Investig.* 16: 153–154.

Johnson-Delaney, C.A. 2006. Reptile zoonoses and threats to public health. In Reptile medicine and surgery 2nd ed., Mader, D. (ed.). Saunders Elsevier, St. Louis, Missouri, pp. 1017–1030.

Johnsrude, J.D., Raskin, R.E., Hoge, A.Y., Erdos, G.W. 1997. Intraerythrocytic inclusions associated with iridoviral infection in a fer de lance (*Bothrops moojeni*) snake. Vet. Pathol. 34: 235-238.

Jorge, M.T., de Mendonça, J.S., Ribeiro, L.A., da Silva, M. L., Kusano, E.J., Cordeiro, C.L. 1990. Bacterial flora of the oral cavity, fangs and venom of *Bothrops jararaca*: possible source of infection at the site of bite. Rev. I. Med. Trop. S. P. 32: 6–10.

Jorge, M.T., Ribeiro, L.A., da Silva, M.L., Kusano, E.J., de Mendonca, J.S. 1994. Microbiological studies of abscesses complicating *Bothrops* snakebite in humans a prospective study. Toxicon. 32: 743–748.

Kahane, S., Gonen, R., Sayada, C., Elion, J., Friedman, M.G. 1993. Description and partial characterization of a new *Chlamydia*-like microorganism. FEMS Microbiol. Lett. 109: 329–333.

Kavitha, K.T., Latha, B.R., Bino Sundar, S.T., Jayathangaraj, M.G., Senthil Kumar, K., Sridhar, R., Abdul Basit, S. 2014. *Kalicephalus* sp. in a captive Russell's viper: a case report. J. Parasit. Dis. 38: 293–296.

Korzyukov, Y., Iheozor-Ejiofor, R., Levanov, L., Smura, T., Hetzel, U., Szirovicza, L., de la Torre, J.C., Martinez-Sobrido, L., Kipar, A., Vapalahti, O., Hepojoki, J. 2020. Differences in Tissue and Species Tropism of Reptarenavirus Species Studied by Vesicular Stomatitis Virus Pseudotypes. Viruses. 12: 395.

Kostanjsek, R., Strus, J., Drobne, D., Avgustin, G, 2004. ‘*Candidatus* Rhabdochlamydia porcellionis’, an intracellular bacterium from the hepatopancreas of the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Crustacea: Isopoda). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 54: 543–549.

Lane, D.J., Collins, M.L. 1991. Current Methods for Detection of DNA/Ribosomal RNA Hybrids. In: Vaheri, A., Tilton, R.C., Balows, A. Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology. Springer, Berlin, Heidelberg.

Langwig, K.E., Frick, W.F., Bried, J.T., Hicks, A.C., Kunz, T.H., Marm, K.A. 2012. Sociality, densitydependence and microclimates determine the persistence of populations suffering from a novel fungal disease, white-nose syndrome. *Ecol. Lett.* 15: 1050–1057.

Langwig, K.E., Frick, W.F., Hoyt, J.R., Parise, K.L., Drees, K.P., Kunz, T. H., Foster, J.T., Kilpatrick, A.M. 2016. Drivers of variation in species impacts for a multi-host fungal disease of bats. *Phil. T. Roy. Soc. B.* 371, 20150456.

Lehman H.D. 1972. Zur Behandlung der Coccidiose bei Reptilien. *Salamandra.* 8: 48-49.

Lorch, J.M., Meteyer, C.U., Behr, M.J., Boyles, J.G., Cryan, P.M., Hicks, A.C., Ballmann, A.E., Coleman, J.T.H., Redell, D.N., Reeder, D.M., Blehert, D.S. 2011. Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature.* 480: 376–378.

Lorch, J.M., Lankton, J., Werner, K., Falendysz, E.A., McCurley, K., Blehert, D.S. 2015. Experimental infection of snakes with *Ophidiomyces ophiodiicola* causes pathological changes that typify snake fungal disease. *mBio.* 6: 1–9.

Lorch, J.M., Knowles, S., Lankton, J.S., Michell, K., Edwards, J.L., Kapfer, J.M., Staffen, R.A., Wild, E.R., Schmidt, K.Z., Ballmann, A.E., Blodgett, D., Farrell, T.M., Glorioso, B.M., Last, L.A., Price, S.J., Schuler, K.L., Smith, C.E., Wellehan, J.F.X., Blehert, D.S. 2016. Snake fungal disease: an emerging threat to wild snakes. *Philos. Trans. R. Soc.* 371, 20150457.

Madsen, M., Hangartner, P., West, K., Kelly, P. 1998. Recovery rates, serotypes, and antimicrobial susceptibility patterns of *Salmonellae* isolated from cloacal swabs of wild Nile crocodiles (*Crocodylus niloticus*) in Zimbabwe. *J. Zoo. Wildl. Med.* 29: 31–34.

Marschang, R.E., Becher, P., Posthaus, H., Wild, P., Thiel, H.-J., Müller-Doblies, U., Kaleta, E.F., Bacciarini, L.N. 1999. Isolation and characterization of an iridovirus from Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*). Arch. Virol. 144: 1909–1922.

Marschang, R., Heckers K., Dietz, J., Kolesnik, E. 2016. Detection of a *Mycoplasma sp.* in a python (*Morelia spilota*) with stomatitis. J. Herpetol. Med. Surg. 26: 90-93.

Marschang, R.E., Hetzel, U., Schwartz, D., Michling, R., Matthes, K. 2001. Isolation of viruses from boa constrictors (*Boa constrictor* spp.) with inclusion body disease in Europe. Proceedings AAZV, AAWZ, ARAV, NAZWV, Joint Conference; Orlando, FL, USA. pp. 30–31.

Martel, A.A., Spitzen-van der Sluijs, M., Blooi, W., Bert, R., Ducatelle, M.C., Fisher, A., Woeltjes, W., Bosman, K., Chiers, F., Bossuyt, F., Pasmans, F. 2013. *Batrachochytrium salamandrivorans* sp. nov. causes lethal chytridiomycosis in amphibians. PNAS. 110, 15325–15329.

Martel, A., Blooi, M., Adriaensen, C., van Rooij, P., Beukema, W., Fisher, M.C., Farrer, R.A., Schmidt, B.R., Tobler, U., Goka, K., Lips, K.R., Muletz, C., Zamudio, K.R., Bosch, J., Lötters, S., Wombell, E., Garner, T.W.J., Cunningham, A., Spitzen-van der Sluijs, A., Salvidio, S., Ducatelle, R., Nishikawa, K., Nguyen, T.T., Kolby, J.E., Van Bocxlaer, I., Bossuyt, F., Pasmans, F. 2014. Recent introduction of a chytrid fungus endangers Western Palearctic salamanders. Science. 346: 630–631.

Martinez, J., Segura, P., Garcia D., Aduriz, G., Ibabe, J.C., Peris, B., Corpa, J. 2006. Septicemia secondary to infection by *Corynebacterium macginleyi* in an Indian python (*Python molurus*). Vet. J. 172: 382-385.

McDiarmid, A. 1948. The occurrence of tuberculosis in the wild wood-pigeon. J. Comp. Pathol. Ther. 58: 128–133.

- Mermin, J., Hutwagner, L., Vugia, D., Shallow, S., Daily, P., Bender, J., Koehler, J., Marcus, R., Angulo, F., J. 2004. Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: A populationbased, case-control study. *Clin. Infect. Dis.* 38: 253–261.
- Meteyer, C.U., Buckles, E.L., Blehert, D.S., Hicks, A.C., Green, D.E., Shearn-Bochsler, V., Thomas, N.J., Gargas, A., Behr, M.J. 2009. Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21: 411–414.
- Miller, D.L., Radi, Z.A., Stiver S.L., Thornhill, T.D. 2004. Cutaneous and pulmonary mycosis in green anaconda (*Eunectes murinus*). *J. Zoo Wildl. Med.* 35: 557-561.
- Minnis, A.M., Lindner, D.L. 2013. Phylogenetic evaluation of *Geomyces* and allies reveals no close relatives of *Pseudogymnoascus destructans*, comb. nov., in bat hibernacula of eastern North America. *Fungal Biol.* 117: 638–649.
- Mitchell, C.M., Hutton, S., Myers, G.S., Brunham, R., Timms, P. 2010. *Chlamydia pneumoniae* is genetically diverse in animals and appears to have crossed the host barrier to humans on (at least) two occasions. *PLOS Pathog.* 6, e1000903.
- Neimark, H.C. 1986. Origin and evolution of wall-less prokaryotes. *The bacterial L-Forms*, Marcel Dekkar Inc., New York pp. 21-42.
- Nichols, D.K., Weyant, R.S., Lamirande E.W., Sigler, L., Mason, R.T. 1999. Fatal mycotic dermatitis in captive brown tree snakes (*Boiga irregularis*). *J. Zoo Wildl. Med.* 30: 111-118.
- Orós, J., Arencibia, A., Fernández, L., Jensen, H.E. 2004. Intestinal candidiasis in a loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*): an immunohistochemical study. *Vet. J.* 167: 202-207.
- Parker, B.C., Ford, M.A., Gruft, H., Falkinham, J.O. 1983. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 12: 652–656.
- Pedersen, K., Lassen-Nielsen, A.M., Nordentoft, S., Hammer, A.S. 2009. Serovars of *Salmonella* from captive reptiles. *Zoonoses Public Hlth. Germ.* 56: 238–242.

- Penner, J.D., Jacobson, E.R., Brown, D.R., Adams, H.P., Besch-Williford, C.L. 1997. A novel *Mycoplasma* sp. associated with proliferative tracheitis and pneumonia in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*). J. Comp. Pathol. 117: 283-288.
- Plenz, B., Schmidt, V., Grosse-Herrenthey, A., Kruger, M. Pees, M. 2015. Characterisation of the aerobic bacterial flora of boid snakes. Vet. Rec., 176: 285.
- Plutzer, J., Karanis, P. 2007. Molecular identification of a *Cryptosporidium saurophilum* from corn snake (*Elaphe guttata guttata*). Parasitol. Res. 101: 1141–1145.
- Pulford, C.V., Wenner, N., Redway, M.L., Rodwell, E.V., Webster, H.J., Escudero, R., Kröger, C., Canals, R., Rowe, W., Lopez, J., Hall, N., Rowley, P.D., Timofte, D., Hinton, J., C.D. 2019. The diversity, evolution and ecology of *Salmonella* in venomous snakes. PLOS Neglect. Trop. D. 13, e0007169.
- Radoshitzky S.R., Bao Y., Buchmeier M.J., Charrel R.N., Clawson A.N., Clegg C.S., DeRisi J.L., Emonet S., Gonzalez J.P., Kuhn J.H., Lukashevich. I., Clarens, J.P., Romanowski, V., Salvato, M.S., Stenglein, M.S., De la Torre, J.D. 2015. Past, present, and future of arenavirus taxonomy. Arch. Virol. 160: 1851–1874.
- Reil, I., Špičić, S., Kompes, G., Duvnjak, S., Zdelar-Tuk, M., Stojević, D., Cvetnić, Z. 2017. Nontuberculous mycobacteria in captive and pet reptiles. Acta Vet. Brno. 86: 101-107.
- Rima, B., Balkema-Buschmann, A., Dundon, W.G., Duprex, P., Easton, A., Fouchier, R., Kurath, G., Lamb, R., Lee, B., Rota, P., Wang, L. 2019. Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Paramyxoviridae*. J. Gen. Virol. 100: 1593-1594.
- Rosengarten, R., Citti, C., Much, P., Spergser, J., Droesse, M. and M. Hewicker-Trautwein. 2001. The changing image of mycoplasmas: from innocent bystanders to emerging and reemerging pathogens in human and animal diseases. In: Mühlendorfer, I. and K.P. Schäfer (eds.),

Emerging Bacterial Pathogens, Contrib. Microbiol. Vol. 8, S. Karger, Switzerland, pp. 166-185.

Rosenthal, K L., Mader, D.R. 1996. Microbiology. Reptile Medicine and Surgery. (Mader, D.R.Ed.). W.B. Saunders Co., Philadelphia, Pennsylvania. pp. 117-125.

Rüegg, S.R., Regenscheit, N., Origgi, F.C., Kaiser, C., Borel, N. 2015. Detection of *Chlamydia pneumoniae* in a collection of captive snakes and response to treatment with marbofloxacin. Vet. J. 205: 424–426.

Rurangirwa, F.R., Dilbeck, P.M., Crawford, T.B., McGuire, T.C., McElwain, T.F. 1999. Analysis of the 16S rRNA gene of micro-organism WSU 86–1044 from an aborted bovine foetus reveals that it is a member of the order *Chlamydiales*: proposal of *Waddliaceae* fam. nov., *Waddlia chondrophila* gen. nov., sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 577–581.

Sachse, K., Laroucau, K., Riege, K., Wehner, S., Dilcher, M., Creasy, H.H., Weidmann, M., Myers, G., Vorimore, F., Vicari, N., Magnino, S., Liebler-Tenorio, E., Ruettger, A., Bavoil, P.M., Hufert, F.T., Rosselló-Móra, R., Marz, M. 2014. Evidence for the existence of two new members of the family *Chlamydiaceae* and proposal of *Chlamydia avium* sp. nov. and *Chlamydia gallinacea* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol. 37: 79-88.

Sand, M.A., Latimer, K.S., Gregory, C.R., Rakich, P.M., Jacobson, E., Pennick, K.E. 2004. Molecular diagnosis of paramyxovirus infection in snakes using reverse transcriptase-polymerase chain reaction and complementary deoxyribonucleic acid: ribonucleic acid in situ hybridization. J. Vet. Diagn. Invest. 16: 442–448.

Schad, G.A. 1962. Studies on the genus *Kalicephalus* (Nematoda: *Diaphanocephalidae*) II. A taxonomic revision of the genus *Kalicephalus* Molin, 1861. Can. J. Zool. 40: 1035–1065.

Scheele, B.C., Pasmans, F., Skerratt, L.F., Berger, L., Martel, A., Beukema, W., Acevedo, A.A., Burrowes, P.A., Carvalho, T., Catenazzi, A., De la Riva, I, Fisher, M.C., Flechas, S.V., Foster, C.N., Frías-Álvarez, P.J., Garner, T.W., Gratwicke, B., Guayasamin, J.M., Hirschfeld, M., Kolby, J.E., Kosch, T.A., La Marca, D.B., Lindenmayer, K.R. Lips, A.V. Longo, R.,

Maneyro, C.A., McDonald, J., Mendelson III, E., Palacios-Rodriguez, P., Parra-Olea, G., Richards-Zawacki, C.L., Rödel, M.-O., Rovito, S.M., Soto-Azat, Toledo, L.F., Voyles, J., Weldon, C., Whitfield, S.M., Wilkinson, M., Zamudio, K.R., Canessa, S. 2019. Amphibian fungal panzootic causes catastrophic and ongoing loss of biodiversity. *Science*. 363: 1459-1463.

Scheelings, T.F., Lightfoot, D., Holz, P. 2011. Prevalence of *Salmonella* in Australian reptiles. *J. Wildl. Dis.* 47: 1–11.

Schmidt, V., Marschang, R.E., Abbas, M.D., Ball, I., Szabo, I., Helmuth, R., Plenz, B., Spergser, J., Pees, M. 2013. Detection of pathogens in *Boidae* and *Pythonidae* with and without respiratory disease. *Vet. Rec.* 172: 236.

Schneider, L., Ehlinger, M., Stanchina, C., Giacomelli, M.-C., Gicquel, P., Karger, C., Clavert, J.-M. 2008. *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* bone and joints sepsis. A case report and literature review. *Orthop. Traumatol-Sur.* 95: 237–242.

Schragen, S. 2006. Experimentelle Infektion von juvenilen *Boa constrictor* mit einem Orthoreovirusisolat. Justus-Liebig-Universität Giessen. Giessen, Germany.

Schumacher, J., Jacobson, E., R., Homer B., 1994. Inclusion body disease of boid snakes. *J. Zoo Wildl. Med.* 25: 511-524.

Schumacher, J., Jacobson, E.R., Burns, R., Tramontin, R.R. 1994. Adenovirus-like infection in two rosy boas (*Lichanura trivirgata*). *J. Zoo Wildl. Med.* 25: 461-465.

Schumacher, J. 2003. Fungal diseases of reptiles. *The Veterinary Clinics of North America. Exot. An. Pract.* 6: 327-35.

Scullion, F.T., Scullion, M.G. 2009. Gastrointestinal protozoal diseases in reptiles. *J. Exot. Pet Med.* 18: 266–278.

Selbitz, H.J., Sinell, H.J., Sziegoleit, A. 1995. Das Salmonellen-Problem. Salmonellen als Erreger von Tierseuchen und Zoonosen. Gustav Fischer Verlag, Jena–Stuttgart.

Sigler, L., Hambleton, S., Paré, J.A. 2013. Molecular characterization of reptile pathogens currently known as members of the *Chrysosporium* anamorph of *Nannizziopsis vriesii* complex and relationship with some human-associated isolates. J. Clin. Microbiol. 51: 3338-3357.

Slany, M., Ulmann, V., Slana, I. 2016. Avian mycobacteriosis: still existing threat to humans. Bio. Med. Res. Int. 4387461.

Soldati, G., Lu, Z.H., Vaughan, L., Polkinghorne, A., Zimmermann, D.R., Huder, J.B., Pospischil, A. 2004. Detection of *mycobacteria* and *chlamydiae* in granulomatous inflammation of reptiles: A retrospective study. Vet. Pathol. 41: 388– 397.

Sonntag, F.D., Rüschoff, B., Troll, C., Heckers, K.O., Marschang, R.E. 2021. Bacteria associated with clinically suspected respiratory disease in snakes and effective antimicrobial treatment options. J. Herpetol. Med. Surg. 30: 254-260.

Spergser, J., Hess, C., Loncaric, I., Ramírez, A.S. 2019. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry is a superior diagnostic tool for the identification and differentiation of mycoplasmas isolated from animals. J. Clin. Microbiol. 57, e00316-19.

Spergser, J., Botes, A., Nel, T., Ruppitsch, W., Lepuschitz, S., Langer, S., Ries, S., Dinhopf, N., Szostak, M., Loncaric, I., Busse, H.J. 2020. *Mycoplasma nasistruthionis* sp. nov. and *Mycoplasma struthionis* sp. nov. isolated from ostriches with respiratory disease. Syst. Appl. Microbiol. 43, 126047.

Staub, E., Marti, H., Biondi, R., Levi, A., Donati, M., Leonard, C.A., Ley, S.D., Pillonel, T., Greub, G., Seth-Smith, H.M.B., Borel, N. 2018. Novel *Chlamydia* species isolated from

snakes are temperature-sensitive and exhibit decreased susceptibility to azithromycin. *Sci. Rep.* 8, 5660.

Stegen, G., Pasmans, F., Schmidt, B.R., Rouffaer, L.O., Van Praet, S., Schaub, M., Canessa, S., Laude-lou, A., Kinet, T., Adriaensen, C., Hasebrouck, F., Bert, W., Bossyut, F., Martel, A. 2017. Drivers of salamander extirpation mediated by *Batrachochytrium salamandrivorans*. *Nature*. 544: 353–357.

Stehbens, W.E., Johnson M.R.L. 1966. The viral nature of *Pirhemocytion tarentolae*. *J. Ultrastruct. Res.* 15: 543-554.

Stenglein M.D., Jacobson E.R., Chang L.W., Sanders C., Hawkins M.G., Guzman D.S., Drazenovich T., Dunker F., Kamaka E.K., Fisher D. 2015. Widespread recombination, reassortment, and transmission of unbalanced compound viral genotypes in natural arenavirus infections. *PLOS Pathog.* 11, e1004900.

Stenglein M.D., Sanders C., Kistler A.L., Ruby J.G., Franco J.Y., Reavill D.R., Dunker F., Derisi J.L., 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. *M. Bio.* 3, e00180-12.

Taylor-Brown, A., Vaughan, L., Greub, G., Timms, P., Polkinghorne, A. 2015. Twenty years of research into Chlamydia-like organisms: a revolution in our understanding of the biology and pathogenicity of members of the phylum *Chlamydiae*. *Pathog. Dis.* 73: 1–15.

Thao, M.L., Baumann, L., Hess, J.M., Falk, B.W., Ng, J.C.K., Gullan, P.J., Baumann, P., 2003. Phylogenetic evidence for two new insect-associated *Chlamydia* of the family *Simkaniaceae*. *Curr. Microbiol.* 47: 46–50.

Thompson, C.C., Vieira, N.M., Vicente, A.C., Thompson, F.L. 2011. Towards a genome based taxonomy of mycoplasmas. *Infect. Genet. Evol.* 11: 1798-1804

Thorel, M.-F., Krichevsky, M., Levy-Frebault, V., 1990. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 40: 254–260.

Tortoli, E. 2009. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections. *Clin. Microbiol. Inf.* 15: 906-910.

Turenne, C.Y., Collins, D.M., Alexander, D.C., Behr, M.A. 2008. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* subsp. *avium* are independently evolved pathogenic clones of a much broader group of *M. avium* organisms. *J. Bacteriol.* 190: 2479–2487.

Turnbull, P.C.B. 1979. Food poisoning with special reference to *Salmonella* — its epidemiology, pathogenesis and control. *Clin. Gastroenterol.* 8: 586–594.

Vieler, E., Baumgärtner, W., Herbst, W., Köhler, G. 1994, Characterization of a reovirus from a rattlesnake, *Crotalus viridis*, with neurological dysfunction. *Arch. Virol.* 138: 341–344.

Viney, M.E. and Lok, J.B. 2007. *Strongyloides* spp. *WormBook: Onl. Rev. C. Elegans Biol.* 1–15.

Volokhov, D.V., Simonyan, V., Davidson, M.K and V.E. Chizhikov. 2012. RNA polymerase beta subunit (*rpoB*) gene and the 16S-23S rRNA intergenic transcribed spacer region (ITS) as complementary molecular marker in addition to the 16S rRNA gene for phylogenetic analysis and identification of the species of the family *Mycoplasmataceae*. *Mol. Phylogenet. Evol.* 62: 515–528.

von Reyn, C.F., Waddell, R.D., Eaton, T., Arbeit, R.D., Maslow, J.N., Barber, T.W., Brindle, R.J., Gilks, C.F., Lumio, J., Lähdevirta, J. 1993. Isolation of *Mycobacterium avium* complex

from water in the United States, Finland, Zaire, and Kenya. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3227–3230.

Wang, H.F., Du, L.Y., Luo, J., He, H.X. 2017. Isolation, identification and characterization of *Morganella morganii* from *Naja naja atra* in Beijing, China. *Cell. Mol. Biol.* 63: 52-58.

Warnecke, L., Turner, J.M., Bollinger, T.K., Lorch, J.M., Misra, V., Cryan, P.M., Wibbelt, G., Blehert, D.S., Willis, C.K. 2012. Inoculation of bats with European *Geomyces destructans* supports the novel pathogen hypothesis for the origin of white-nose syndrome. *P. Natl. Acad. Sci.* 109: 6999–7003.

Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., Van Etten, J. 1989. A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* 171: 6455-6467.

Wellehan, J.F.X., Strik, N.I., Stacy, B.A., Childress, A.L., Jacobson, E.R., Telford, S.R. 2008. Characterization of an erythrocytic virus in the family *Iridoviridae* from a peninsula ribbon snake (*Thamnophis sauritus sackenii*). *Vet. Microbiol.* 131: 115-122.

Wilton, S., Cousins, D. 1992. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. *PCR Methods Appl.* 1: 269–273.

Winfield, M.D., Groisman, E.A. 2004. Evolution and Ecology of *Salmonella*. *EcoSal Plus*. United States.

Woese, C.R., Maniloff, J., Zablen, L.B. 1980. Phylogenetic analysis of the *Mycoplasma*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 494-498.

Xiao, L., Ryan, U.M., Graczyk, T.K., Limor, J., Li, L., Kombert, M., Junge, R., Sulaiman, I.M., Zhou, L., Arrowood, M.J., Koudela, B., Modrý, D., Lall, A.A. 2004. Genetic diversity of *Cryptosporidium* spp. in captive reptiles. *Appl. Environ. Microb.* 70: 891–899.

Zaher, H., Murphy, R.W., Arredondo, J.C., Graboski, R., Machado-Filho, P.R., Mahlow, K., Montingelli, G.G., Bottallo Quadros, A., Orlov, N.L., Wilkinson, M., Zhang, Y., Graziotin, F.G. 2019. Large-scale molecular phylogeny, morphology, divergence-time estimation and the fossil record of advanced caenophidian snakes (*Squamata: Serpentes*). PLOS One. 14, e0217959.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stammdatenblatt der beprobten Schlangen	14
Tabelle 2: Die für die PCR-Amplifikation verwendeten Primer	24
Tabelle 3: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-Gen-Amplifikation.....	25
Tabelle 4: Thermozyklische Bedingungen für die 16S rRNA-Gen Amplifikation.....	25
Tabelle 5: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-Gen-Amplifikation (Mykobakterien)	26
Tabelle 6: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des 16S rRNA-Gens von Mykobakterien.....	26
Tabelle 7: Reaktionsansatz für die Amplifikation der <i>Internal-Transcribed-Spacer-Region</i> (ITS1-5.8 rRNA-ITS2)	27
Tabelle 8: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation der <i>Internal-Transcribed-Spacer-Region</i> (ITS1-5.8 rRNA-ITS2)	27
Tabelle 9: Reaktionsansatz für die <i>omp2</i> -Gen Amplifikation	28
Tabelle 10: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des <i>omp2</i> -Gens	28
Tabelle 11: Reaktionsansatz für die 16SrRNA-Gen Amplifikation.....	29
Tabelle 12: Thermozyklische Bedingungen für die Amplifikation des 16SrRNA-Gens von Chlamydien.....	29
Tabelle 13: Kulturell nachgewiesene Bakterien und Pilze in Choanentupfern (Ch) und Kloakentupfern (Kl) sowie Ergebnisse des PCR-Nachweises von Chlamydien und Mykobakterien.....	31
Tabelle 14: Serotypisierungsergebnisse der <i>Salmonella</i> -Isolate	37
Tabelle 15: Sequenzähnlichkeitswerte gewonnener Mykoplasmenisolate zu nächstverwandten Mykoplasmenarten	40