

Grundsätzliches zur virologischen Diagnostik bei Schildkröten

von Dr. Rachel E. Marschang,
Institut für Umwelt- und Tierhygiene, Universität Hohenheim

Einleitung

Viren sind infektiöse Partikel, die nur in ihrer Wirtszelle repliziert werden können. Sie sind sehr klein (20-300 nm) und besitzen keinen eigenen Stoffwechsel. Sie bestehen aus einem Genom aus Desoxyribonukleinsäure (DNS) oder Ribonukleinsäure (RNS), umgeben von virusspezifischen Proteinen, die das Kapsid bilden. Bei manchen Viren ist das Kapsid noch von einer Lipidhülle umgeben (behüllte Viren). Das Genom trägt die für die Vermehrung (Replikation) der Viren notwendige Informationen. Das Kapsid schützt das Genom vor äusseren Einflüssen in der Umwelt und hilft ihm, in eine Wirtszelle einzudringen. Daneben kann es bei der Replikation helfen. Bei behüllten Viren tragen Glykoproteine an der Lipidhülle dazu bei, dass das Virus eine Zelle infizieren kann. Viren können nur mit Hilfe ihrer Wirtszelle vermehrt werden. Hierzu wird die infizierte Zelle verändert. In vielen Fällen wird sie in eine „Virusfabrik“ umgewandelt.

Es gibt verschiedene Methoden, Viren bei Landschildkröten nachzuweisen. Die Sensitivität eines Testes zeigt dabei an, wie gut eine Methode Tiere identifizieren kann, die ein bestimmtes Virus in sich tragen. Sie gibt den Anteil der infizierten, also positiven, Tiere einer Population an, die korrekt positiv getestet werden. Die Spezifität andererseits zeigt an, wie gut man mit dieser Methode ein Tier erkennen kann, das nicht infiziert ist, das heißt den Anteil der nicht infizierten, also negativen, Tiere der Population, der korrekt negativ getestet wird. Ein positives Ergebnis von einem Patienten, der eigentlich negativ ist, wird als falsch positives Ergebnis definiert. Ein negatives Ergebnis von einem Patienten, der eigentlich positiv ist, wird als falsch negatives Ergebnis definiert.

Bei der Diagnostik kann man grundsätzlich zwischen Methoden unterscheiden, die das Virus selber oder Teile davon nachweisen und Methoden, die die Reaktion des Körpers auf die Infektion, die Immunreaktion, nachweisen. Zweiteres wird über die Serologie gemacht.

Virusnachweismethoden:

Mehrere Methoden stehen für den Nachweis einer Virusinfektion zur Verfügung. Grundsätzlich möglich sind:

- Nachweis von Veränderungen in den infizierten Zellen
- Vermehrung des Virus außerhalb des Wirtskörpers (Zellkultur)
- Nachweis von Virusteilen, d.h. Teile des Genoms oder Proteinbestandteile

Nachweis von Veränderungen in den infizierten Zellen

Nachdem eine Wirtszelle durch ein Virus infiziert wird, führt das Virus zu Veränderungen in der Zelle. In vielen Fällen wird die Wirtszelle zu einer „Virusfabrik“ umgebaut. Bei manchen Viren kommt es an bestimmten Stellen in der Zelle zu einer so starken Anreicherung von Virusbestandteilen, dass diese mikroskopisch dargestellt werden können. Diese Ansammlungen nennt man Einschlusskörperchen. Bei den Herpesvirusinfektionen der Schildkröten entstehen häufig große Einschlusskörperchen in den Zellkernen. Bei Ranavirusinfektionen entstehen manchmal Einschlusskörperchen im Zytoplasma betroffener Zellen. Der Nachweis solcher Einschlusskörperchen kann durch Nekrosen oder sekundäre bakterielle Infektionen oder durch Autolyse, wenn das Tier schon länger tot ist, erschwert oder unmöglich gemacht werden. Einschlusskörperchen sind wichtige Hinweise auf eine Infektion. Um die genaue Ursache eines Einschlusses nachzuweisen, sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig. Wenn das Gewebe gut erhalten ist, kann man es

elektronenmikroskopisch untersuchen, um zu versuchen, die Viren selber darzustellen. Dies ist allerdings relativ aufwendig und kann nur von wenigen Laboren durchgeführt werden. Daneben gibt es Methoden, um bestimmte Viren spezifisch anzufärben. Hierzu gehören die Immunhistochemie und die *in situ* Hybridisierung.

Bei der Immunhistochemie wird ein gegen das gesuchte oder vermutete Virus gerichteter Antikörper eingesetzt. Dieser wird an einen Farbstoff gebunden. Wenn man nun ein Gewebeschnitt mit diesem Antikörper anfärbt, bindet der Antikörper an im Gewebe vorhandenen Virus und man kann ein Farbsignal im Mikroskop erkennen. Bei der *in situ* Hybridisierung ist die Vorgehensweise ähnlich, es wird aber ein markiertes DNS-Stück eingesetzt, das sich mit dem Virusgenom im Gewebe verbindet und diese spezifisch markiert. Bei Schildkröten wurden sowohl die Immunhistochemie als auch die *in situ* Hybridisierung für den Nachweis von Herpesviren bei Landschildkröten beschrieben. Allerdings wird keine dieser Untersuchungen zur Zeit routinemäßig für die Diagnose von Herpesviren bei Landschildkröten eingesetzt.

Vermehrung des Virus in Zellkultur

Mit dieser Methode können Viren in Proben von Tieren im Labor vermehrt, identifiziert und weiter untersucht werden. Sie wird in mehreren Laboren in Deutschland als Untersuchungsmethode für Landschildkröten eingesetzt. Man kann Herpesviren und Ranaviren sehr gut in Zellkultur vermehren. Daneben können auch andere bei Schildkröten vorkommende Viren mit dieser Methode nachgewiesen werden. Hierzu gehören Picorna-artige Viren (Virus „X“), Reoviren und Paramyxoviren. Die Methode selbst ist nicht für ein bestimmtes Virus spezifisch, sondern kann theoretisch alle Viren nachweisen, die sich in einer bestimmten Probe befinden, vermehrungsfähig sind und sich in den eingesetzten Zellen unter den eingesetzten Bedingungen (v.a. Temperatur) vermehren können. Für die Isolierung von Viren aus Schildkröten stehen verschiedene Zellen zur Verfügung. Am häufigsten werden Terrapene Herzzellen (TH-1), die von Dosenschildkröten stammen und permanent in Kultur wachsen, eingesetzt. Die Temperatur spielt bei der Isolierung von Viren aus Reptilien eine große Rolle. So vermehren sich die meisten Reptilienviren in Zellkultur nicht bei zu hohen Temperaturen. In der Regel werden die Zellen bei 28 °C bebrütet. Wenn Viren sich in Zellen vermehren, werden diese oft so verändert, dass es im Mikroskop sichtbar wird. Diese Veränderungen werden zytopathische Effekte (ZPE oder CPE) genannt. Am häufigsten sterben die infizierten Zellen, teilweise mit typischen Veränderungen (Vergrößerung der Zelle, Einschlusskörperchen, Verschmelzung mit angrenzenden Zellen). Wenn man ein Virus in Zellkultur isoliert hat, muss man es noch identifizieren. Der erste Schritt hierzu ist der ZPE. Dieser sieht für verschiedene Viren unterschiedlich aus. Daneben können bestimmte Viruseigenschaften überprüft werden (behüllt, DNS oder RNS, Größe des Virus). Mittels Elektronenmikroskopie kann das Virus direkt dargestellt werden, hierzu sind aber sehr viele Viruspartikel nötig. In Zellkultur isolierte Viren können auch mit Hilfe der im nächsten Abschnitt beschriebenen Methoden (z.B. PCR) identifiziert werden.

Nachweis von Virusteilen

Man kann sowohl das Genom (d.h. DNS oder RNS) von Viren als auch Proteinbestandteile nachweisen. Die hierfür eingesetzten Methoden unterscheiden sich. Bei Viren, die Schildkröten betreffen, wurden Methoden für den Nachweis von Proteinbestandteilen von Herpesviren beschrieben. Diese Methoden werden aber nicht als diagnostische Mittel in Deutschland angeboten und werden hier nicht näher beschrieben. Methoden, die einen Nachweis des Genoms eines bestimmten Virus erlauben, werden hingegen immer häufiger in der Diagnostik eingesetzt. Hierbei spielt v.a. die Polymerase Kettenreaktion (PCR) eine große Rolle. Bei RNS Viren spricht man von einer RT-PCR (reverse Transkriptase PCR) Bei der PCR wird ein definierter Abschnitt des Genoms des Virus vervielfältigt. Damit wird es

nachweisbar, sozusagen sichtbar gemacht. Voraussetzung für die PCR ist, dass man das Genom des gesuchten Virus zumindest zum Teil kennt. Eine PCR ist immer für ein bestimmtes Virus spezifisch, andere Viren, die möglicherweise die gleichen Krankheitssymptomen verursachen könnten, werden nicht erkannt. Bei der PCR werden Primer eingesetzt. Diese Primer sind kurze DNS Stücke, die zu einem bestimmten Abschnitt des viralen Genoms passen. Mit Hilfe eines Enzyms (die Taq-Polymerase) und verschiedener Zutaten (Bausteine der DNS, Salze, Puffer) wird genau der Abschnitt der Ziel DNS immer wieder kopiert, dessen Sequenz zwischen den zwei Primern liegt. Somit wird ein DNS-Stück einer definierten Länge tausendfach vermehrt. Das Ergebnis der Reaktion kann man durch den Nachweis dieser DNS mit der definierten Länge mittels Elektrophorese überprüfen. Bei RNS Viren muss vor der Hauptreaktion zuerst die RNS in DNS umgeschrieben werden, denn die PCR funktioniert nur mit DNS als Ausgangsmaterial. Hierzu werden wieder ein Primer und ein Enzym eingesetzt, die reverse Transkriptase. Die entstandene cDNS (komplementär DNS) wird dann in der PCR eingesetzt. Um die Spezifität der Reaktion zu sichern und um das Produkt zu charakterisieren, kann das PCR Produkt weiter untersucht werden. Hierfür wird am häufigsten die Sequenzierung eingesetzt. Das heißt, man bestimmt die genaue Sequenz des vermehrten DNS Abschnittes. Diese Sequenz kann man dann mit Sequenzen bekannter Viren vergleichen, um festzustellen, ob das Produkt spezifisch ist für das gesuchte Virus und ob es mit bereits beschriebene Sequenzen übereinstimmt.

PCRs werden zunehmend als diagnostische Mittel in der Reptilienvirologie eingesetzt. Bei Schildkröten werden sie als Standardmethode für den Nachweis von Herpesviren und Ranaviren eingesetzt. Daneben können sie für viel exotischere Viren wie Reo- oder Paramyxoviren eingesetzt werden. Der große Vorteil der PCR ist ihre Sensitivität. Theoretisch reicht eine einzige Kopie des gesuchten Genomabschnittes, um eine positive Reaktion zu erhalten. Das Virus muss, im Gegensatz zum Nachweis mittels Zellkultur, auch nicht vermehrungsfähig sein. Allerdings kann die PCR nur dasjenige Virus nachweisen, wofür sie gemacht wurde. Ein anderes Virus, das die gleichen Symptomen verursacht, kann nicht nachgewiesen werden. Auch können Viren sich mit der Zeit verändern. Wenn das Virus sich zu stark verändert, beispielsweise wenn sich die Sequenzen an den Primerbindungsstellen verändern, kann es mit der alten PCR nicht mehr nachgewiesen werden. Viren, von denen keine Sequenzen bekannt sind (beispielsweise das Picorna-artige Virus „X“ bei Landschildkröten) können nicht mittels PCR nachgewiesen werden.

Serologie

Bei der Serologie werden vom Wirtstier gegen ein Virus gebildete Antikörper nachgewiesen. Dies setzt voraus, dass das Tier mit dem Virus infiziert gewesen ist und ausreichend Zeit hatte, Antikörper zu bilden. Bei Schildkröten wird die Serologie v.a. eingesetzt, um Antikörper gegen Herpesviren nachzuweisen. Daneben können Antikörper gegen das Picorna-artige Virus „X“, Reoviren und Paramyxoviren nachgewiesen werden. Hierbei wird am häufigsten ein Virusneutralisationstest eingesetzt. Dabei wird eine definierte Virusmenge mit einer Verdünnungsreihe aus Serum oder Plasma vermischt, inkubiert (damit eventuell im Serum vorhandene Antikörper an das Virus binden können) und dann auf Zellen gegeben. Wenn Antikörper in ausreichender Menge im Serum vorhanden sind, wird das Virus „blockiert“ und kann die Zellen nicht infizieren. Der Test ist relativ langsam (ein bis zwei Wochen, je nach Virus) und die eingesetzten Zellen können vom Schildkrötenserum getötet werden („toxischer Effekt“). In solchen Fällen kann das Ergebnis erst nach Verdünnung des Serums abgelesen werden. Solche Probleme können zu falsch negativen Ergebnisse führen. Bei der serologischen Untersuchung von Schildkröten muss bedacht werden, dass die Bildung von Antikörper bei Reptilien relativ langsam ist. Das heißt, dass erst mehrere Wochen nach einer Infektion Antikörper nachgewiesen werden können. Zusätzlich ist die Antikörperbildung von äußeren Umständen (z.B. der Temperatur) abhängig. Bei einer akuten

Krankheit mit starken klinischen Symptomen ist es in der Regel sinnvoller, Virusnachweismethoden einzusetzen. Die Serologie kann dann zu einem späteren Zeitpunkt eingesetzt werden, am häufigsten um festzustellen, ob ein Tier schon mal in seinem Leben eine Infektion mit einem bestimmten Virus durchgemacht hat (beispielsweise der Nachweis von Antikörper gegen Herpesviren im Laufe einer Quarantäne).

Proben

Bevor man in einem virologischen Labor Proben untersuchen lässt, sollte man sich beim Untersuchungslabor über die idealen Transportbedingungen informieren. Als Regel gilt, dass Proben möglichst frisch und möglichst schnell nach der Entnahme im Labor ankommen sollten. Als Probenmaterial können bei lebenden Tieren v.a. Rachen- und Kloakentupfer oder auch Nasenspülproben untersucht werden. Bei toten Tieren gilt, dass veränderte Organe immer mitgeschickt werden sollten. Bei Schildkröten haben sich die Zunge, der Darm, die Leber und die Lungen als besonders sinnvoll für die virologische Untersuchung gezeigt. Die Proben für die virologische Untersuchung sollten in einer sterilen Flüssigkeit, niemals jedoch in halbfesten Bakterientransportmedien, transportiert werden.

Beim Versand von Probenmaterial ist es immer wichtig, die betroffene Spezies und einen kurzen Vorbericht anzugeben. Es macht einen großen Unterschied in der Vorgehensweise des Labors, ob das Tier gesund ist und eine routinemäßige Untersuchung auf Herpesviren durchgeführt werden sollte, oder ob es sich um ein krankes Tier mit einer therapieresistente Krankheit unbekannter Ursache handelt. Am günstigsten ist, die Proben durch einen schildkrötenerfahrenen Tierarzt an das Labor schicken zu lassen. Dieser kann dann auch bei der Interpretation der Ergebnisse behilflich sein. Auch das Labor kann dabei behilflich sein.

Grundsätzlich hängt der Erfolg einer virologischen Untersuchung von vielen Faktoren ab. Besitzer können dabei helfen, zutreffende Ergebnisse zu erhalten, in dem sie die Probennahme rechtzeitig mit ihrem Tierarzt und gegebenenfalls mit dem Untersuchungslabor besprechen, ausreichende Hintergrundinformationen (inklusive betroffene Spezies) liefern, und frische, ordentlich verpackte Proben einschicken.