

Infektionen durch *Pseudomonas aeruginosa* bei der Palästina viper, *Vipera xanthina palaestinae*

YAFFA KEYDAR, EMANUEL EYLAN, HEINRICH MENDELSSOHN & URI MARDER

Mit 8 Abbildungen

Einleitung

Mundfäule, eine Krankheit, die gelegentlich bei Schlangen in Gefangenschaft auftritt, wurde REICHENBACH-KLINKE (1963) zufolge erstmalig von REINHARD (1927) beschrieben. Später isolierte BURTSCHER (1931) *Pseudomonas fluorescens liquifaciens* bei 44 mit Mundfäule befallenen Schlangen, die 13 verschiedenen Arten angehörten. Dieser Autor konnte die Krankheit auch mit Erfolg bei gesunden Schlangen hervorrufen, indem er die betreffenden Bakterien in die Mundhöhlen der Tiere übertrug. PAGE (1961) isolierte *Aeromonas* sp. aus einer mit ulzerativer Stomatitis befallenen *Lampropeltis* aus Ecuador. Er konnte durch Übertragung der Bakterien ebenfalls die gleiche Krankheit bei anderen Schlangen hervorrufen.

Es ist bekannt, daß Schlangen verschiedenste pathogene Bakteriengruppen beherbergen können wie etwa *Salmonella*, *Arizona*, *Mycobacterium*, *Spirochaeta* und *Aeromonas*. Dabei brauchen nicht immer Symptome einer Krankheit sichtbar zu sein (REICHENBACH-KLINKE 1963; PAGE 1966).

Bei der in Israel weitverbreiteten Palästina viper (*Vipera xanthina palaestinae* WERNER 1938), konnten wir seit 1961 zahlreiche Krankheits- und Todesfälle feststellen. Andere im selben Serpentarium gehaltene Schlangen, wie etwa die Aspispiper (*Vipera aspis*), die Sandviper (*Vipera ammodytes*), die Levante viper (*Vipera lebetina*) und die Kettenviper (*Vipera russelii*) zeigten keine klinisch faßbaren Krankheitssymptome. Die Zahl der Todesfälle unter den Palästina vipern betrug in den drei Jahren 1963–1965 dagegen 80,8 % der insgesamt von dieser Art gehaltenen Tiere. In der Annahme, daß es sich dabei um die Auswirkungen einer ansteckenden Bakterienkrankheit handeln könnte, die sich unter den Vipern in Gefangenschaft ausbreitet, entschlossen wir uns, die Ursachen und die Art der Übertragung dieser Krankheit zu untersuchen. Danach sollten mit Hilfe experimenteller Infektionen Wege zur Verhütung und Behandlung gesucht werden.

Material und Methoden

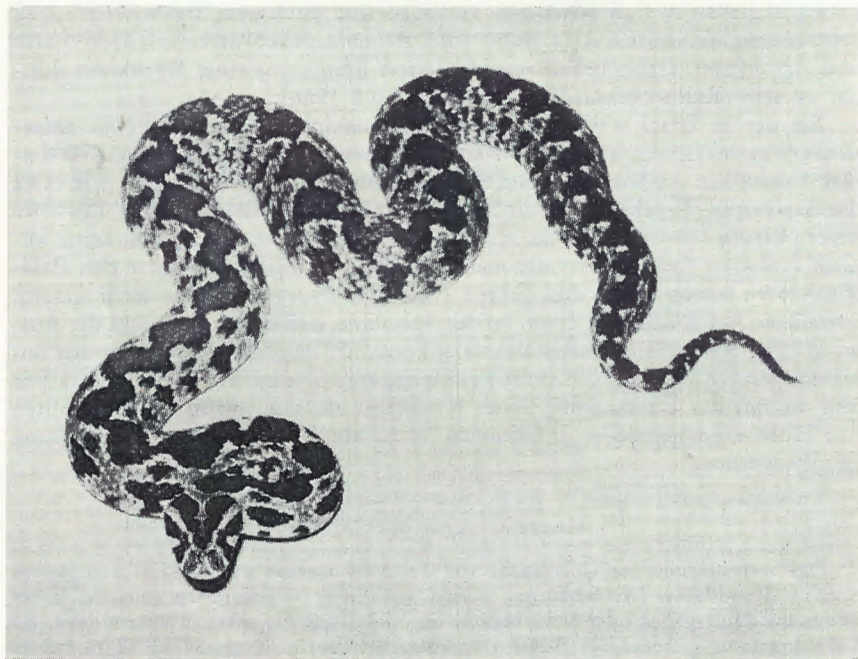
Das Serpentarium der Universität von Tel-Aviv umfaßt zwei Räume von jeweils 8×3 m Grundfläche. Die Schlangen werden einzeln in Glasterrarien gehalten, deren Boden mit Holzspänen oder Sand bedeckt ist. Elektrische Heizplatten dienen dazu, die Lufttemperatur während des Winters in jedem Behälter zwischen 24–32 °C zu halten.

Die in beiden Räumen vorhandene Zentralheizung genügt, um im Frühjahr und Herbst die notwendige Temperatur zu erreichen.

Jeder Schlange werden wöchentlich eine oder zwei Labormäuse geboten, den größeren Vipern auch kleine Ratten. Ein kleiner Behälter bietet das notwendige Trinkwasser. Normalerweise werden etwa 150-200 Schlangen verschiedenster Arten im Serpentarium gepflegt; der weitaus größte Teil davon sind Palästinavipern. Den Vipern wird Gift mittels einer von zwei gebräuchlichen Methoden entnommen. Vor dem Auftreten der geschilderten Epidemie wurden die Vipern mit einem Lasso-Stock, der eine gepolsterte Lederschlinge aufwies, aus ihrem Behälter gehoben. Dann wurde die Schlange längs des Stockes ausgestreckt und ein Glasgefäß gegen die Mundöffnung der Schlange gedrückt. Wenn die Schlange nicht in das Gefäß biß, drückten wir dessen Rand unter die Giftzähne. Durch Drücken auf die Kopfseiten wurde das Gift in das Glasgefäß gespritzt.

Von 1963 an benutzten wir eine schonendere Methode zur Behandlung der Vipern. Die Schlange wurde mit einem Schlangenhaken aus ihrem Behälter gehoben und auf den Tisch gelegt, der mit weichem Tuch bedeckt war. Dann drückten wir ihr den Kopf mit dem Schlangenhaken auf die Unterlage und ein Assistent ergriff den Körper des Tieres, um das Seitwärtsschlagen zu verhindern. Mittels einer langen Pinzette wurde die Mundöffnung der Schlange geschlossen, festgehalten und so das Beißen verhindert. Dann wurde ihr Kopf angehoben, mit drei Fingern gehalten und das Gift auf die vorher beschriebene Weise gewonnen.

Abb. 1. Fast erwachsene, gesunde Palästinavipere (*Vipera xanthina palaestinae*). $\times 1/4$. — Aufn. Dr. K. KLEMMER.
Subadult, healthy *Vipera xanthina palaestinae*.



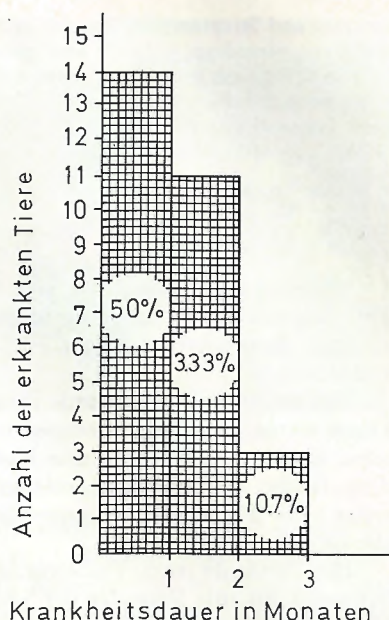
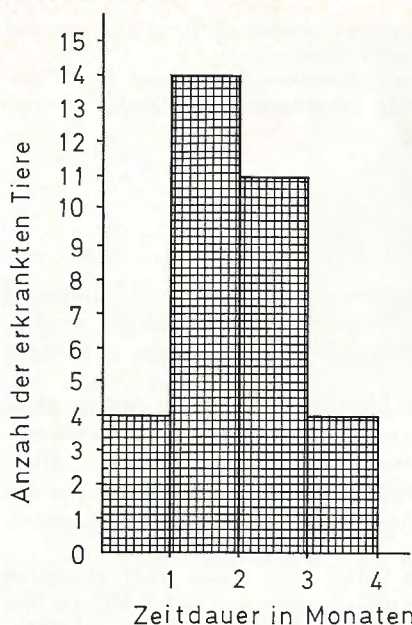


Abb. 2 (links). Der Zeitbeginn des Krankheitsausbruches bei *Vipera xanthina palaestinae*.
Time of begin of the disease in *Vipera x. palaestinae*.

Abb. 3 (rechts). Die Dauer der Erkrankung bei *Vipera xanthina palaestinae*.
Duration of the disease in *Vipera x. palaestinae*.

Die von einer ausgewachsenen *Vipera xanthina palaestinae* bei einer Prozedur erhaltene Giftmenge variiert zwischen 400 und 600 mg (KOCHVA 1960).

Zur Bestimmung der Bakterienflora wurden sowohl Kulturen aus den Abstrichen gemacht, die der Mundhöhle der Schlangen entnommen wurden, als auch aus dem Gift. Dazu benutzten wir Agar-Nährplatten (Difco), Blut Agar, MACCONKEYS Agar und Thioglycolatbouillon. Gesunde Schlangen wurden wiederholten bakteriologischen Prüfungen unterzogen. Kranke Tiere wurden während verschiedener Phasen ihrer Krankheit und ebenso post mortem untersucht. Einer histologischen Prüfung unterzogen wir die Giftdrüsen und Gehirne sowohl von gesunden als auch von kranken Exemplaren.

In dem Bestreben, die Ursachen der fraglichen Krankheit zu finden, wurden einigen Schlangen verschiedene Bakterien-Arten injiziert. Bei einigen Exemplaren applizierten wir die Bakterien in die Giftdrüsen. Andere Schlangen wurden mit Mäusen gefüttert, die vorher mit verschiedenen Bakterien infiziert worden waren. Alle Versuchstiere waren in einem besonderen Raum untergebracht. Sie wurden regelmäßig auf Krankheitssymptome untersucht und ihr Gift einer bakteriologischen Prüfung unterzogen.

Die Bakterienflora aus dem Mund kranker Schlangen benutzten wir zur Prüfung der Empfindlichkeit gegen folgende antibakterielle Substanzen: Chloramphenicol, Penicillin, Furadantin, Erythromycin, Aureomycin, Tetracyclin, Polymyxin B-Sulfat, Sul-

fadiazin und Streptomycin. Die drei letztgenannten erschienen als die wirksamsten und mit ihnen versuchten wir auch eine vorbeugende Behandlung.

Die Giftdrüsen gesunder und kranker Vipern wurden histologisch durch Dr. N. ROZIN untersucht, dem Direktor des Pathologischen Laboratoriums am Zahalon Government Hospital in Jaffa.

Ergebnisse

Während einer Zeitspanne von drei Jahren (1963-65) gelangten insgesamt 281 Palästinavipern, die in verschiedenen Teilen von Israel gefangen wurden, in unser Serpentarium. Von diesen starben 227 (80,8 %) an der erwähnten Krankheit.

Nur bei zwei Vipern wurde bei ihrem Eintreffen festgestellt, daß sie schon krank waren. Die übrigen zeigten im allgemeinen die ersten Krankheitssymptome, nachdem sie einen bis drei Monate im Serpentarium gelebt hatten. Allerdings fanden sich bei einigen Schlangen bereits Anzeichen der Erkrankung in den ersten zwei Wochen der Gefangenschaft. Andere hielten mehr als 4 Monate aus, ehe sie erkrankten (Abb. 2).

Die Zeitdauer vom Trübwerden des Giftes, dem ersten wahrnehmbaren Symptom, bis zum Verenden der Schlange umfaßte gewöhnlich 1-2 Monate. Bei 50 % der Fälle dauerte die Krankheit einen Monat, bei 33,3 % ein bis zwei Monate und in 10,7 % bis zu drei Monaten (Abb. 3). In einigen wenigen Fällen dauerte die Krankheit 8-10 Monate. Eine spontane Heilung wurde niemals beobachtet.

Das Verenden der Schlangen war nicht saisonbedingt: sie starben während des ganzen Jahres. In bezug auf die Anfälligkeit konnten keine Unterschiede bezüglich Geschlecht und Alter festgestellt werden.

Beschreibung der Krankheitssymptome

Das erste Anzeichen der Erkrankung ist das Trübwerden des Giftes. Normalerweise stellt das Gift der Palästinavipere eine klare, fluoreszierende, bernsteinfarbene Flüssigkeit dar. Dagegen ist dasjenige kranker Schlangen inhomogen getrübt, gräulich und in der Menge vermindert und macht einen etwas eiterigen Eindruck. Das Innere des Mundes verliert seine normale rosa Färbung und die Schleimhaut wird von einer dünnen, grau-weißen Schicht überzogen. Die Blutgefäße sind in ihr nicht mehr sichtbar und häufig wird der Mund eiterig. In der Mehrzahl der Fälle wird der Mund schief gehalten als Folge einer Lähmung des Unterkiefers. Schwerkranke Schlangen sind nicht mehr in der Lage zu züngeln. Charakteristisch für das letzte Stadium der Krankheit sind krampfartige Kontraktionen und spiralförmige Bewegungen des ganzen Körpers, Drehen des Kopfes um die Längsachse von einer Seite zur anderen und verminderte Atmung. Das typische Ausatemgeräusch tritt nicht mehr auf. Damit einher geht eine Verminderung oder gänzliches Erlöschen der Giftproduktion (Abb. 4 und 5).

Abb. 4. Kopf einer erkrankten Viper. Der offene Rachen ist eine Folge der Lähmung des Unterkiefers.
Head of a diseased viper with mouth agape, due to paralysis of lower jaw.



Zur Diagnose

Das eiterig entzündete Aussehen der Mundhöhle und das Trübwerden des Giftes deuteten darauf hin, daß die Krankheit bakterielle Ursachen hat. Demzufolge wurde zunächst versucht, die normale Bakterienflora im Mund der Viper zu studieren. Es wurden daher zu verschiedensten Zeiten des Jahres Abstriche aus den Mundhöhlen von 100 gesunden Vipern gemacht und deren Gift gesammelt. Dabei verglichen wir die Ergebnisse von Tieren, die verschieden lange in Gefangenschaft gehalten worden waren. Ebenso wurde auch die Bakterienflora der Mundhöhle und des Giftes von 12 neu gefangenen Vipern, die gerade ins Serpentarium gelangt waren, untersucht.

Abb. 5. Mundhöhle einer erkrankten Viper. Die Entzündung der Giftzahnstaschen ist gut zu erkennen.
Mouth cavity of diseased viper exposed to show inflammation around the fangs.



Tab. 1. Bakterienflora im Gift von 50 erkrankten Vipern.

Zahl der Vipern	Bakterieller Befund
40	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	<i>Arizona</i>
1	<i>Proteus morgani</i>
1	<i>Proteus mirabilis</i>
1	<i>Citrobacter (E. freundii)</i>
1	<i>Cloaca</i>

Tab. 2. Bakterieller Befund bei 12 Todesfällen als Folge der Krankheit.

Untersuchtes Organ	Bakterieller Befund	Positive Fälle
Giftdrüsen	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
	<i>Arizona</i>	1
	<i>Proteus morgani</i>	1
Gehirn	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Lunge	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
Leber	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3

Die vorherrschende Flora des Mundes bei den untersuchten Schlangen in Gefangenschaft bestand aus Vertretern der Enterobacteriaceae: Angehörigen der Gattungen *Escherichia* (*E. coli* und *freundii*), *Proteus*, *Arizona* und *Cloaca*. Ebenso fanden wir Arten der Gattungen *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Neisseria*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas* und *Alkaligenes*.

Das Gift war steril, abgesehen von Ausnahmen, in denen es durch nicht ganz sorgfältige Gewinnung mit einer der Bakterienarten aus der Mundhöhle schwach verunreinigt worden war. Insgesamt fanden wir das Gift bei 9 von 12 Vipern steril, während es bei den verbleibenden drei einige der normalen Mundhöhlenbakterien enthielt. Die Bakterienflora der Mundhöhle war bei der Kontrollgruppe etwa die gleiche wie die bei den gesunden, in Gefangenschaft gehaltenen Vipern.

Pseudomonas aeruginosa fanden wir bei zwei von 12 Schlangen, aber nur in der Mundhöhle und nicht im Gift.

Eine bakteriologische Untersuchung des Giftes wurde alle drei Wochen insgesamt 5 Monate lang bei 50 Vipern vorgenommen, die bei ihrem Eintreffen im Serpentarium gesund waren, später aber erkrankten. In allen Fällen blieb das Gift steril bis die ersten Krankheitssymptome auftraten.

In 40 Fällen isolierten wir *Ps. aeruginosa* als die alleinige oder vorherrschende Bakterienart. Es war stets im Gift vorhanden, wenn dieses trübe und eiterig wurde. Bei den verbleibenden 10 anderen Schlangen fanden sich verschiedene Bakterienarten wie *Arizona*, *Escherichia freundii*, *Proteus* und *Cloaca* (Tab. 1).

Bei 12 Schlangen, die an der Krankheit verendeten, wurden Gehirn, Giftdrüsen, Lunge und Leber untersucht. In 10 Fällen entdeckten wir *Ps. aeruginosa*

in den Giftdrüsen und im Gehirn, bei zwei Schlangen auch in den Lungen und in drei Fällen in der Leber.

Zwei der Vipern erwiesen sich als *Ps. aeruginosa*-negativ. Allerdings wurden in den Giftdrüsen der einen *Proteus morgani* und in denen der anderen *Arizona* (Tab. 2) gefunden.

Beschreibung von *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa ist ein bewegungsfähiges, gram-negatives Bakterium, das einzeln, in Paaren oder in kurzen Reihen vorkommt, und gegenständige Geißeln besitzt. Auf Nähr-Agar bildet es große, ausgedehnte Kolonien mit durchscheinenden unregelmäßigen Rändern. Im allgemeinen ist die Färbung ein fluoreszierendes Grün, das später in Braun übergeht. Der Mikroorganismus vergärt nicht Zucker, verflüssigt aber Gelatine und reduziert Nitrate in Nitrite und Stickstoff. Aus Glucose bildet es weder Azeton, noch bildet es H_2S . Es reduziert Methylen-Blau und enthält Katalase. Die Indol-Reaktion ist negativ. Wachstum findet in der Anwesenheit von KCN statt. Der Temperaturbereich für das Wachstum umfaßt 5-42 °C. Optimales Wachstum findet bei 37 °C statt.

Histologische Befunde

Sagittalschnitte der Giftdrüsen kranker Palästinavipern zeigen Hyperplasie eines kernreichen Entzündungsgewebes mit Infiltrationen phagozytärer und monocytärer Zellen sowie Erythrocyten. Das Innere der aus den Giftdrüsen ab-

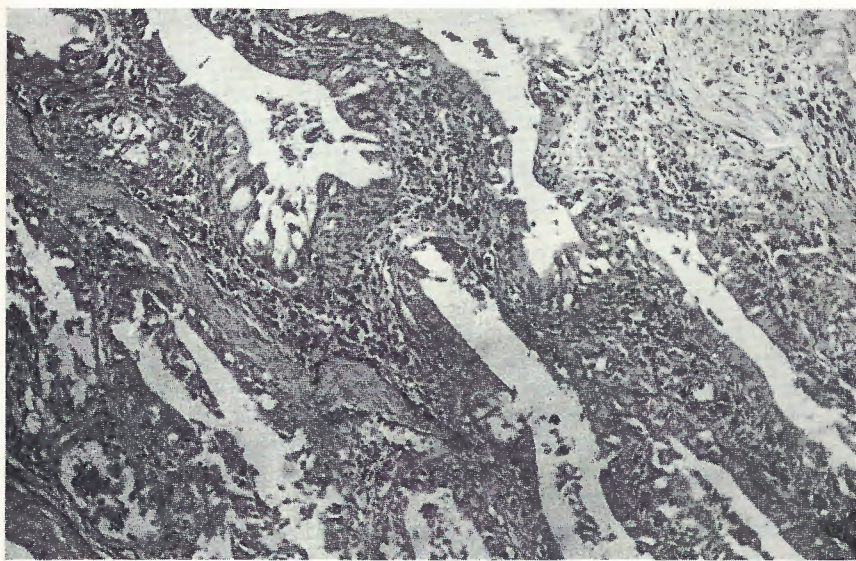


Abb. 6. Längsschnitt durch eine Giftdrüse von *Vipera x. palaestinae*. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. $\times 60$.

Sagittal section of venom gland. Haematoxylin-eosin stain.

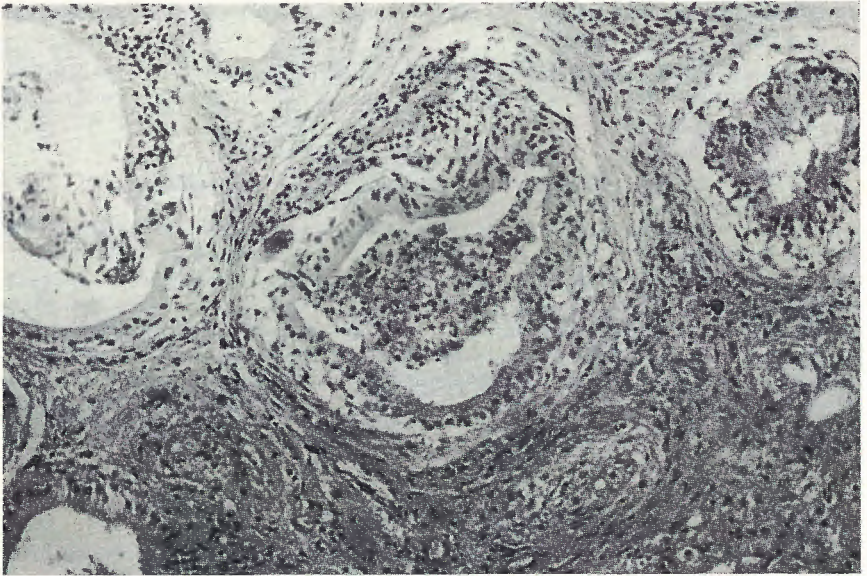


Abb. 7. Querschnitt durch eine Giftdrüse von *Vipera x. palaestinae*. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. $\times 120$.

Cross section of venom gland. Haematoxylin-eosin stain.

leitenden Gänge enthält nekrotisches Material (Abb. 6). Querschnitte kranker Giftdrüsen zeigen, daß die Ausführungsgänge von einer dicken Schicht umgeben sind, die aus kernhaltigem Gewebe gebildet wird, infiltriert durch zahlreiche Entzündungszellen. Das Innere enthält Massen nekrotischen Materials, bestehend aus abgeschilferten Epithelzellen und vielen Phagocyten (Abb. 7).

Infektions- und Therapieversuche

Wir infizierten sowohl Giftschlangen als auch ungiftige Schlangen mit *Ps. aeruginosa* und verschiedenen Enterobacteriaceen, die aus verendenden Vipern isoliert wurden. Bakterien, die dazu verwendet wurden, waren außer *Ps. aeruginosa* noch *Arizona* sp., *Proteus morgani* und *Salmonella typhimurium*.

In den ersten Versuchsserien infizierten wir Schlangen der Gattungen *Teleoscopus*, *Eirenis* und *Coluber* durch intraperitoneale Injektion, durch orale Eingaben oder Darbietung von Mäusen, die mit verschiedenen Bakterien infiziert waren. Jedes der Experimente wurde mit jeweils zwei Schlangen durchgeführt. Sie werden nachfolgend öfters als „Paar“ bezeichnet. Damit soll jedoch kein Hinweis auf das Geschlechtsverhältnis der Tiere gegeben sein.

Die intraperitoneal injizierten Schlangen erhielten eine Dosis von 6×10^8 Bakterien in 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung. Für die orale Infektion

wurden die gleichen Bakterien in der vorstehenden Konzentration benutzt und die infektiöse Dosis mit einer Pipette in die Mundhöhle gebracht. Anderen Schlangen boten wir Albino-Mäuse, denen 24 Stunden vorher 0,3 ccm physiologische Kochsalzlösung mit 6×10^8 Bakterien injiziert worden waren. Die mit *Salmonella typhimurium* infizierten Mäuse verendeten 18 Stunden nach der Ansteckung und waren, als sie den Schlangen angeboten wurden, bereits tot. Alle anderen Mäuse wurden jedoch von den Schlangen vor dem Verschlucken selber getötet.

In einer anderen Versuchsreihe injizierten wir 0,3 ccm physiologischer Kochsalzlösung, die eine Mischung aller vier Bakteriengruppen enthielt, $1,5 \times 10^8$ Bakterien jeder Gruppe, in jeweils 2 Schlangen, während die gleiche Dosis an ein zweites „Paar“ verfüttert wurde. Die Kontrolltiere untersuchten wir täglich. Keines zeigte irgendwelche Symptome und alle lebten noch am Ende der viermonatigen Versuchszeit.

In einer zweiten Serie von Experimenten wurden drei Paar Vipern mit *Arizona*, *Salmonella typhimurium* bzw. *Proteus morgani* infiziert. Die ansteckende Dosis von 2×10^8 Bakterien in 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung injizierten wir in beide Giftdrüsen. Auf ähnliche Weise wurde ein viertes Vipernpaar mit *Ps. aeruginosa* infiziert, die wir aus einer kranken Palästina viper isoliert

Tab. 3. Experimentelle Infektion von Vipern mit verschiedenen Bakterien.

Schlange Nr.	Bakterienflora des Giftes vor der Infektion:	Infiziert mit:	Bakterieller Befund des Giftes nach der Infektion:	Überleben nach der In- fektion (in Tagen):
1	steril	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. typhimurium</i> , <i>Aerobacter</i>	0
2	<i>Aerobacter</i>	<i>S. typhimurium</i>	Diphtheroide, <i>Micrococcus</i>	0
3	steril	<i>P. morgani</i>	<i>Micrococcus</i> , Diphtheroide	0
4	steril	<i>P. morgani</i>	<i>P. morgani</i> , <i>Aerobacter</i>	0
5	<i>Proteus</i>	<i>Arizona</i>	<i>Neisseria</i> , <i>Proteus</i> , Diphtheroide	0
6	steril	<i>Arizona</i>	<i>Micrococcus</i> , <i>Arizona</i>	0
7	steril	<i>Ps. aeruginosa</i> ¹⁾	<i>Ps. aeruginosa</i>	4
8	steril	<i>Ps. aeruginosa</i> ¹⁾	<i>Ps. aeruginosa</i>	66
9	steril	<i>Ps. aeruginosa</i> ²⁾	<i>Ps. aeruginosa</i>	5
10	steril	<i>Ps. aeruginosa</i> ²⁾	<i>Ps. aeruginosa</i>	2
11	steril	<i>S. typhimurium</i> <i>P. morgani</i> <i>Arizona</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Arizona</i> , <i>S. typhimurium</i>	4
12	<i>Neisseria</i> <i>Aerobacter</i>	<i>Ps. aeruginosa</i> ¹⁾ <i>Ps. aeruginosa</i> ²⁾	<i>Ps. aeruginosa</i>	6

¹⁾ *Pseudomonas* isoliert von einer kranken Viper.

²⁾ *Pseudomonas* isoliert von einer gesunden Viper.

hatten. Ein fünftes Paar erhielt *Ps. aeruginosa* aus der Mundhöhle einer gesunden Viper und ein sechstes Paar eine Mischung aller 4 Bakteriengruppen. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in Tab. 3 dargestellt.

Schlangen, die mit *Salmonella typhimurium*, *Proteus* oder *Arizona* infiziert waren, zeigten innerhalb von 6 Wochen keine Krankheitssymptome. Wiederholte bakteriologische Untersuchungen ergaben, daß ihr Gift steril war oder verschiedene Diptheroide, Staphylococci oder *Cloaca* enthielt. Eine der zwei Schlangen, die mit *Salmonella typhimurium* infiziert waren, wies einige Wochen nach der Ansteckung eine kleine Menge dieser Mikroben in ihrem Gift auf. In allen Fällen blieb dieses klar und behielt seine normale Viskosität.

Die zwei Schlangen-Paare, die mit *Pseudomonas* infiziert worden waren, wurden ein bis zwei Tage nach der Ansteckung sichtlich krank. Drei dieser Vipern verendeten innerhalb von 5 Tagen. In Kulturen, die aus Giftdrüsen und aus Mundhöhlen gewonnen wurden, wuchs *Pseudomonas* rein oder doch überwiegend. Die vierte Schlange, die ebenfalls zu Beginn der Versuchsserie mit *Pseudomonas* infiziert worden war, zeigte einige Tage nach der Ansteckung eine Anschwellung des hinteren Teiles des Kopfes und ein deutliches Hervortreten des rechten Auges. Sie stellte die Nahrungsaufnahme ein, verlor an Gewicht und ihr Gift wurde trüb und eiterig. Wiederholte Prüfung des Giftes während 9 Wochen

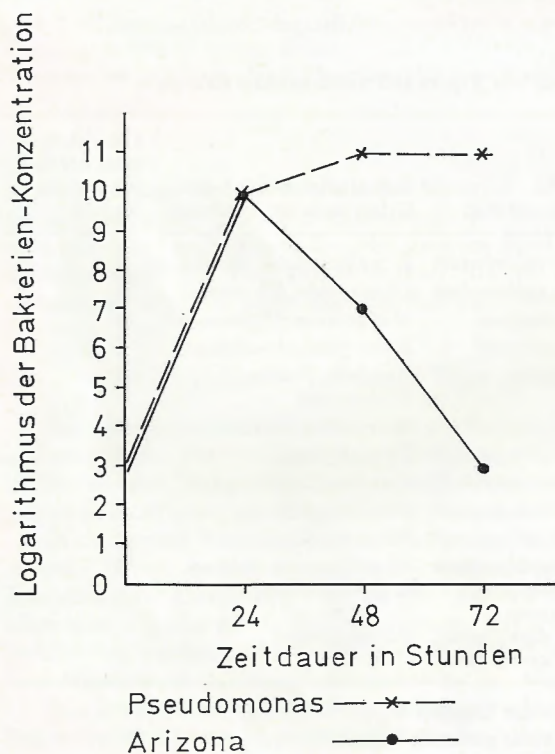


Abb. 8. Wachstum von *Pseudomonas* und *Arizona* im Viperngift.
Growth of *Pseudomonas* and *Arizona* in viper venom.

ergab *Pseudomonas* in Reinkultur. Die Schlange verendete schließlich 66 Tage nach der Ansteckung.

Von Interesse ist die Feststellung, daß *Pseudomonas*, die von dieser Schlange vor der Infektion isoliert wurden, gegen Sulfadiazin und Streptomycin empfindlich waren. Dagegen waren solche, die nach der Infektion isoliert worden waren, resistent gegen diese antibakteriellen Substanzen. Zwei Schlangen, die eine Mischung der verschiedenen Bakterien (40×10^6 Bakterien von jeder der 4 Gruppen) in 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung erhielten, erlagen der Krankheit und verendeten zwei bzw. 6 Tage nach der Infektion. Nach dem Tode ergaben die Giftdrüsen und die Mundhöhle der einen Schlange eine gemischte Kultur von *Salmonella typhimurium*, *Arizona*, *Proteus* und *Pseudomonas*. Dabei dominierte die letztgenannte Form. Die Giftdrüsen und Mundhöhle der zweiten Viper ergaben eine Reinkultur von *Pseudomonas*. In beiden Fällen waren die Mikroorganismen resistent gegen Sulfadiazin und Streptomycin.

Injektionen von Dosen von 0,1 ccm einer *Pseudomonas*-Suspension in die Giftdrüsen zweier männlicher und zweier weiblicher Palästinavipern hatten 5 Tage nach der Infektion den Tod aller vier Schlangen zur Folge.

Die Ergebnisse aller dieser Versuche zeigen, daß nur solche Schlangen, die mit *Pseudomonas* infiziert wurden, entweder in Reinkultur oder zusammen mit verschiedenen anderen Bakterien, Veränderungen in der Konsistenz des Giftes und weitere typische Symptome der Krankheit aufweisen und schließlich verenden. Unterschiede bei den Geschlechtern wurden diesbezüglich nicht festgestellt.

Experimentelle Infektionen mit verschiedenen Konzentrationen von *Pseudomonas aeruginosa*

Drei Paare Vipern infizierten wir in die Giftdrüsen *Pseudomonas*, die aus einer verendenden Viper gewonnen waren. Jeweils 2 Tiere erhielten 2×10^8 , 2×10^6 und 2×10^4 Bakterien, alle in 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung verteilt. Diejenigen Vipern, denen die stärkste Dosis verabreicht wurde, starben an der Krankheit 4-5 Tage nach der Infektion. Solche die mit 2×10^6 Einheiten injiziert waren, zeigten erst 1-2 Monate nach Versuchsbeginn Krankheitssymptome und verendeten $1\frac{1}{2}$ - $2\frac{1}{2}$ Monate nach der Infektion. Die Schlangen, die Bakterienmengen von 2×10^4 bekommen hatten, wurden nach 3 - $3\frac{1}{2}$ Monaten krank und starben nach $3\frac{1}{2}$ -4 Monaten. Die Giftdrüsen und das Gehirn enthielten bei allen Tieren *Pseudomonas*.

Experimentelle Fütterung von Vipern mit infizierten Albino-Mäusen

Jeder von 7 Palästinavipern wurde eine Maus angeboten, die 24 Stunden vorher intraperitoneal mit *Pseudomonas* injiziert worden war. Drei von vier Schlangen, die infizierte Mäuse annahmen, zeigten am Ende der dritten Woche Krankheitssymptome. In ihrem Gift fand sich *Pseudomonas*. Sie verendeten nach 21, 71 bzw. 90 Tagen. Die vierte Schlange produzierte 90 Tage lang steriles Gift. Danach wies dieses Exemplar auch *Pseudomonas* in seinem Gift auf, wurde krank und starb 124 Tage nach der Infektion.

Von den drei Schlangen, welche die Annahme infizierter Mäuse verweigerten, verendete eine 37 Tage später, ohne irgendein Anzeichen der Krankheit gezeigt zu haben. Ihr Gift blieb von normaler Konsistenz und enthielt nach dem Tode keine *Pseudomonas*. Die übrigen zwei Vipern blieben vollständig gesund. Ihr Gift war normal.

Experimentelle Verunreinigung des Giftes

Es sollte der Einfluß von *Pseudomonas*, die aus dem Gift oder den Giftdrüsen einer infizierten Viper isoliert worden waren, auf normales Gift untersucht werden. Dazu entnahmen wir Gift von verschiedenen gesunden Exemplaren und versetzten dieses mit *Ps. aeruginosa*, die post-mortem aus einer kranken Viper entnommen wurden.

In jedes von zwei Reagenzgläsern wurden 3 ccm normales steriles Gift und 0,1 ccm physiologischer Kochsalzlösung gegeben, wobei letztere entweder 10^3 *Pseudomonas*- oder *Arizona*-Bakterien enthielt. Das infizierte Gift wurde bei 37 °C bebrütet. Anschließend beimpften wir mit Proben davon drei Tage lang in 24 Stunden Abstand Difco-Nährböden. Wie in Abb. 8 dargestellt, vermehrten sich 24 Stunden nach der Beimpfung die *Arizona* auf 8×10^{10} und die *Pseudomonas* auf 12×10^{10} . In beiden Fällen blieb das Gift klar und fluoreszierend. Nach 48 Stunden fiel die *Arizona*-Anzahl auf 10^7 und nach 72 Stunden auf 2×10^3 . Das Gift veränderte sich während der ganzen Zeit nicht. Im Gegensatz dazu schlug das mit *Pseudomonas* versetzte Gift nach 48 Stunden in ein trübes Weiß um, verlor seine normale Fluoreszenz und wurde zähflüssig. Die Anzahl der Mikroorganismen wuchs gleichzeitig auf 2×10^{11} an. Nach 72 Stunden Inkubation zeigten sich beim Gift keine weiteren Veränderungen. Mit *Pseudomonas* versetztes Gift ähnelt also nach 48 Stunden solchem von kranken Vipern.

Empfindlichkeit gegenüber Chemotherapeutika

Wir isolierten *Pseudomonas* aus gefangenen Vipern, die von den verschiedenen Stadien der Krankheit befallen waren; ebenso aus verendeten Schlangen, die bereits bei der Ankunft im Serpentarium befallen waren; weiterhin aus experimentell infizierten Schlangen, aus den Behältern der Vipern und aus anscheinend gesunden Vipern. Alle diese Wuchsplatten wurden mit Hilfe der Blättchen-Methode (Difco-Unidisks) hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegen verschiedene antibakterielle Substanzen geprüft.

Unabhängig von ihrer Herkunft erwiesen sich alle Kulturen resistent gegen Penicillin, Furadantin, Aureomycin, Tetracyclin und Erythromycin, aber empfindlich gegen Polymyxin B. Kulturen, die aus gesunden Schlangen und einige, welche aus Vipern-Behältern stammten, waren empfindlich gegen Sulfadiazin und Streptomycin.

Pseudomonas aus einer kranken Viper, wie auch solche aus der Mundhöhle einer gesunden, wurden quantitativ mit Polymyxin geprüft (0,5; 5; 50 γ und 0,5 mg). Die Bakterien waren resistent gegen 0,5 γ nach 24stündigem Kontakt, aber empfindlich gegen alle anderen Konzentrationen. Nach 72 Stunden sprachen die Bakterien nur auf Konzentrationen von 50 γ und 0,5 mg an.

Versuche zur Heilung unternahmen wir in verschiedenen Stadien der Krankheit. Im ersten Experiment wurde jede von 10 Vipern mit einem Fleischstück von Hühnerküken, das eine Tablette Polymyxin (125 mg) und Multivitamine enthielt, zwangsgefüttert.

In einem zweiten Experiment erhielten drei Gruppen von 12 Schlangen je Tier eine einmalige Injektion von 10 mg Polymyxin. Bei einer Gruppe wurde sowohl in die Rückenmuskulatur als auch in die Giftdrüsen injiziert. Die Schlangen der zweiten Gruppe erhielten das Präparat nur in die Rückenmuskulatur, während wir es denjenigen der dritten Gruppe intraperitoneal applizierten.

In einer dritten Versuchsreihe wurde 4 Vipern zweimal wöchentlich 5 Wochen lang je 1 mg Polymyxin in die Giftdrüsen injiziert.

Bei allen drei Versuchsreihen starben die Schlangen ohne irgendein Anzeichen der Besserung.

Bei einem abschließenden Experiment erhielten 5 Schlangen täglich 10 Tage lang Injektionen von 1 mg Polymyxin in ihre Giftdrüsen. Vier der 5 Schlangen gesundeten nach 2-3 Monaten. Ihr Gift wurde allmählich klar, fluoreszierend und frei von *Pseudomonas*. Die fünfte Schlange verendete, aber offensichtlich durch Verhungern. Bei der Obduktion erwiesen sich nämlich ihre Organe als *Pseudomonas*-frei.

Diskussion

Die in unserem Serpentarium aufgetretene Krankheit scheint auf einer spezifischen Infektion der Giftdrüsen der Schlangen zu beruhen, die durch *Pseudomonas aeruginosa* hervorgerufen wird. Die Infektion kann sich bis zum Gehirn ausbreiten, Lähmung des Unterkiefers bewirken und auch auf die Eingeweide übergreifen. Bei gefangen gehaltenen Tieren kann sie die Ausmaße einer Epidemie annehmen. Der Erreger wurde wohl aus der Mundhöhle gesunder Schlangen, nicht aber aus deren Gift isoliert. Wir nehmen an, daß Verletzungen, die beim Hantieren mit den Schlangen bei der Giftgewinnung auftreten, die Verbreitung der Infektion erleichtern oder es den Bakterien ermöglichen, gesunde Gewebe anzugreifen. Vipern, die im gleichen Serpentarium wie die kranken Exemplare gehalten wurden, zeigten keine Krankheitssymptome, bevor sie zur Giftgewinnung benutzt wurden. Schlangen anderer Arten und Gattungen, die im gleichen Raum lebten, wurden selten oder nicht infiziert.

Ulzerative Stomatitis (gewöhnlich als „Mundfäule“ bezeichnet), die bei Schlangen in Gefangenschaft durch *Aeromonas hydrophila* hervorgerufen wird, (PAGE 1961, 1966; HEYWOOD 1967), unterscheidet sich von der beschriebenen Krankheit in der Entstehung und im klinischen Bild. Während BURTSCHER (1931) Mundfäule bei 13 Schlangenarten nachwies, fanden wir die von uns beschriebene Krankheit nur bei *Vipera xanthina palaestinae* und es gelang nicht, sie auf verschiedene Arten nichtgiftiger Schlangen oder auf andere Vipern-Arten zu übertragen.

Einzelne Fälle mit Symptomen, die einer *Pseudomonas*-Infektion glichen, wurden bei *Echis coloratus*, *Pseudocerastes fieldi*, *Walterinnesia aegyptia* und *Telescopus dhara* beobachtet. Als eine Anzahl von *Cerastes cerastes* und *Echis coloratus* gemolken wurden, beobachteten wir, daß die Exemplare, die schonend nach der zweiten, oben beschriebenen Methode, behandelt worden waren, nicht geschädigt wurden. Die Exemplare, die während des Melkens mit dem Lassostock festgehalten wurden, starben fast alle nach ein- bis zweimaligem Melken unter Erscheinungen, die eine *Pseudomonas*-Infektion vermuten ließen. Diese Beobachtung bestätigt die Vermutung, daß beim Melken erlittene Verletzungen die Ausbreitung der *Pseudomonas* von der Mundhöhle aus ermöglichen.

Pseudomonas aeruginosa ist empfindlich für Polymyxin B. Wir konnten kranke Vipern durch wiederholte Injektionen dieses Medikamentes in die Giftdrüsen oder die Rückenmuskulatur erfolgreich behandeln.

Nach Abschluß dieser Arbeit wurde festgestellt, daß Polymyxin B, oral mit den Futtertieren verabreicht, bei gesunden Schlangen den Ausbruch der *Pseudomonas*-Infektion in vielen Fällen verhindern kann. Eine solche Präventivbehandlung ist vor allem bei neu erhaltenen Schlangen empfehlenswert. Einer großen Viper von 800-1000 g wurde eine Tablette (125 mg) Polymyxin B gegeben, kleineren Schlangen entsprechend weniger. Den Schlangen wurde drei bis vier Monate lang einmal pro Monat Polymyxin verabreicht.

Es wurde festgestellt, daß Feuchtigkeit im Terrarium und unreines Wasser die Verbreitung der Infektion begünstigen. Seitdem wird in unseren Serpentarien die Einstreu der Käfige trocken gehalten und die Schlangen bekommen nur einmal pro Woche zu trinken, wobei das Wassergefäß nur eine Nacht im Terrarium gelassen wird.

Zusammenfassung

Im Serpentarium der Universität Tel-Aviv brach unter den gefangen gehaltenen *Vipera xanthina palaestinae* eine Krankheit aus, verbunden mit einem Massensterben. Die Sterblichkeit betrug 80,8% (227 Todesfälle bei einer Gesamtzahl von 281 Schlangen).

Der Beginn der Krankheit, der zumeist einen Monat nach dem Fang einsetzte, war in Veränderungen des Giftes zu erkennen. Das Sekret der Giftdrüsen, das normalerweise eine klare, leuchtend gelbgrüne Farbe hat, wurde dicklich weiß, eiterähnlich und spärlich.

Die Giftdrüsen und Giftzahntaschen waren entzündet, das Innere des Rachens geschwollen und nekrotisch. Vor dem Tode trat eine Lähmung des Unterkiefers ein. Die Bakterienflora im Rachen gesunder Vipern enthielt hauptsächlich Enterobacteriaceae. Vertreter der Bacillaceae, Corynebacteriae, Micrococcaceae und Pseudomonadeae wurden ebenfalls vorgefunden. Das Gift war immer steril.

Wiederholte Untersuchungen von Gift und Giftdrüsen der kranken und toten Vipern ergaben, daß *Pseudomonas aeruginosa* der einzige oder beherrschende Mikroorganismus in 80% aller Fälle war. Diese Bakterien zeigten sich gegenüber den herkömmlichen antibakteriellen Mitteln resistent, reagierten aber empfindlich auf eine Konzentration von 5 ml Polymyxin-B-sulfat.

Um die Ätiologie der Krankheit zu bestimmen, wurden Schlangen der Gattungen *Vipera*, *Coluber*, *Eirenis* und *Telescopus* mit *P. morgani*, *S. typhimurium*, *Arizona* und *Ps. aeruginosa*, die aus kranken Vipern isoliert wurden, infiziert. Von den verschiedenen infizierten Gruppen erkrankten nur Vipern, die mit *Ps. aeruginosa* oder mit *Ps. aeruginosa* in einer Mischung mit anderen Bakterien infiziert waren.

Eine Infektion mit 2×10^4 Mikroorganismen genügte, um Erkrankung und Tod der Vipern zu verursachen. Die Schlangen konnten auch durch Fütterung mit infizierten Mäusen angesteckt werden.

Bei post-mortem Untersuchungen konnten die Mikroorganismen regelmäßig aus dem Gift und den Giftdrüsen isoliert werden.

Infizierte Vipern konnten durch wiederholte Einspritzungen von Polymyxin (1-2 mg pro Injektion, Gesamtdosis 10 mg) in die Giftdrüsen oder in die Rückenmuskulatur gerettet werden.

Summary

Disease and mass mortality has been encountered in the Tel-Aviv University serpentarium in captive *Vipera xanthina palaestinae*. The mortality rate was 80,8% (227 lethal cases out of a population of 281 vipers).

Onset of the disease, which mostly occurred about one month after capture, was marked by changes in the venom. The venom, normally of a clear, fluorescent, yellow-green color, became turbid white, viscous, purulent, and scarce.

The venom glands and the fang region were inflamed, the lining of the mouth swollen and necrotic. Prior to death, lower jaw paralysis occurred.

Bacterial flora in the mouth of healthy vipers comprised predominately Enterobacteriaceae. Members of the Bacillaceae, Corynebacteriae, Micrococcaceae and Pseudomonadeae were also represented. The venom, however, was sterile.

Repeated examination of venom and venom glands of diseased and dead vipers, revealed *Pseudomonas aeruginosa* as the sole or predominating microorganism in 80% of cases. This bacterium was resistant to the usual antibacterial drugs, but sensitive to a concentration of 5 ml Polymyxin-B-sulphate.

To determine the etiology of the disease, snakes of genera *Vipera*, *Coluber*, *Eirenis* and *Telescopus* were inoculated with *P. morgani*, *S. typhimurium*, *Arizona* and *Ps. aeruginosa*, all isolated from diseased vipers. Of the various snake groups infected, only vipers showed disease and consequent death (4-5 days later), upon inoculation with either pure *Ps. aeruginosa* or same in mixture with the other bacteria.

Disease and death of vipers followed inoculation with as few as 2×10^4 of the microorganisms, and could be induced also by feeding vipers on *Ps. aeruginosa*-infected mice.

On post-mortem, the microorganism was isolated from the venom and venom glands.

Infected vipers could be cured by repeated injections of Polymyxin (1-2 mg per injection, for total dose 10 mg) into the venom glands or back muscles.

Schriften

- BURTSCHER, J. (1931): Über die Mundfäule der Schlangen. — Zool. Garten, N. F., 4: 235-244.
- HEYWOOD, R. (1968): *Aeromonas* infection in snakes. — Cornell Vet., 58: 236-241.
- KLAUBER, L. M. (1956): Rattlesnakes. — Berkeley (Univ. California Press).
- KOCHVA, E. (1960): A quantitative study of venom secretion by *Vipera palaestinae*. — Amer. J. Trop. Med. & Hyg., 9: 381-390.
- PAGE, L. A. (1961): Experimental ulcerative stomatitis in king snakes. — Cornell Vet., 51: 258-266.
- — — (1966): Disease and infections of snakes. A review. — Bull. Wildlife Dis. Assoc., 2: 111-126.
- REICHENBACH-KLINKE, H. H. (1963): Krankheiten der Reptilien. — Stuttgart (G. Fischer).

Verfasser: Dr. Yafa KEYDAR, Prof. Dr. EMANUEL EYLAN, Department of Microbiology, University of Tel-Aviv, Tel-Aviv, Israel.
Prof. Dr. HEINRICH MENDELSSOHN, URI MARDER, M. Sc., Department of Zoology, University of Tel-Aviv, Tel-Aviv, Israel.