

“Boid inclusion body disease”: het enigma ontrafeld?

Boid inclusion body disease: the enigma unraveled?

T. Hellebuyck, J. Simard

Vakgroep Pathologie, Bacteriologie, Pluimveeziekten,
Faculteit Diergeneeskunde, UGent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Tom.hellebuyck@ugent.be

SAMENVATTING

“Boid inclusion body disease” (BIBD) is een wereldwijd voorkomende aandoening bij boa’s en pythons. De exacte oorzaak van de aandoening bleef gedurende lange tijd onopgehelderd. Recent werd met behulp van hedendaagse diagnostische methoden en experimentele studies overtuigend bewijs geleverd dat reptarenavirussen het oorzakelijk agens zijn van BIBD. In tegenstelling tot wat algemeen wordt verondersteld, kunnen boa’s en pythons langdurig subklinische dragers zijn van deze virale ziekte. Alhoewel het oorzakelijk agens van BIBD werd aangetoond is het diagnosticeren van BIBD een uitdaging naargelang de betrokken slangensoort. Bovendien blijft het differentiëren tussen comorbiditeiten gerelateerd aan BIBD en klachten veroorzaakt door andere gelijktijdige ziekteprocessen problematisch. In dit artikel worden het ziekteverloop van BIBD bij pythons en boa’s en het management van de ziekte bij in gevangenschap gehouden slangen beschreven.

ABSTRACT

Boid inclusion body disease is a worldwide occurring disease in boas and pythons. The identity of the etiological agent of the disease remained elusive for several decades. Recently however, contemporary diagnostic methods and experimental studies delivered compelling proof that a group of divergent reptarenaviruses are the causative agents of BIBD. In contrast to what was initially thought, boid snakes can be persistent carriers of the viral disease without showing clinical signs. Although the cause of BIBD has been demonstrated, the diagnosis of BIBD may be challenging depending on the involved snake species, and the differentiation between comorbidities related to BIBD and clinical disease caused by concurrent disorders remains problematic. In this article, the course of BIBD infection in boid snakes, the major differences that are encountered towards the diagnosis of BIBD in pythons versus boas and the overall management of BIBD in captive snake collections are described.

INTRODUCTIE

“Boid Inclusion Body Disease” (BIBD) is een wereldwijd voorkomende aandoening bij boa’s (familie Boidae) en pythons (familie Pythonidae) die veroorzaakt wordt door reptarenavirussen (Stenglein et al., 2012; 2015; 2017). De ziekte wordt gekarakteriseerd door het voorkomen van eosinofiele en amfofiele intracytoplasmatische inclusies in neuronen van het centrale zenuwstelsel (CZS) en in epitheliale cellen van een groot aantal organen (Hetzal et al., 2013; Hyndman et al., 2019; Stenglein et al., 2017). In dit artikel

wordt IBD beschouwd als het voorkomen van deze inclusies bij boa’s en pythons en wordt gerefereerd aan BIBD als een aandoening waarbij reptarenavirusinfectie vastgesteld wordt en in de meeste gevallen geassocieerd is met het voorkomen van karakteristieke BIBD-inclusies. Hoewel er voor reptarenavirussen een ondubbelzinnig oorzakelijk verband met BIBD werd aangetoond (Hetzal et al., 2013; Stenglein et al., 2017), blijven sommige aspecten van de diagnose van deze aandoening een uitdaging vormen afhankelijk van de betrokken slangensoort (Simard et al., 2019). Bovendien blijft het tot op heden onduidelijk welke

symptomen primair aan reptarenavirusinfectie kunnen toegewezen worden. Zo wordt een aanzienlijk aantal van de in gevangenschap gehouden boa constrictors (*Boa constrictor*) routinematig gediagnosticeerd met persistente en subklinische BIBD-infectie. Bij deze slangen is het vaststellen van BIBD eenvoudig maar bestaat het risico dat om het even welk klinisch symptoom toegewezen wordt aan de virale infectie zonder dat er een duidelijk causaal verband kan aangetoond worden (Simard et al., 2019). Bij pythons met suggestieve symptomen van BIBD-infectie daarentegen vormt de correcte diagnose van de aandoening een grote uitdaging en zijn de testen bij veel van de aangetaste dieren vermoedelijk valsnegatief (Hyndman et al., 2019; Simard et al., 2019).

ETIOLOGIE EN EPIDEMIOLOGIE

De eerste beschrijving van IBD werd gepubliceerd in 1994 en documenteert de associatie van klinische ziekte die sinds de jaren zeventig van de vorige eeuw bij boa constrictors (*Boa constrictor*) en pythons vastgesteld wordt, met het voorkomen van karakteristieke IBD-inclusies (Schumacher et al., 1994). Bij de met IBD geïnfecteerde boa's in de studie van Schumacher et al. (1994) werd een traag progressief verloop van symptomen beschreven. De initiële symptomen waren aspecifiek, bestonden onder andere uit intermitterende regurgitatie, anorexie en stomatitis en evolueerden na verloop van maanden naar neurologische symptomen (opisthotonus, evenwichtsstoornissen, incoördinatie, tremoren, paralyse). Bij de pythons daarentegen werden enkel snel progressieve neurologische symptomen beschreven. Volgend op de eerste rapportering werden twee beperkte experimentele infecties uitgevoerd, enerzijds met een supernatant en anderzijds met een gefiltreerd leverhomogenaat afkomstig van IBD-positieve slangen (Chang en Jacobson, 2010). Bij beide experimenten traden na inoculatie CZS-symptomen op bij de geïnoculeerde dieren. Er werd eveneens aangetoond dat de IBD-inclusies bestaan uit een accumulatie van een uniek 68 kDa-proteïne (IBD proteïne, IBDP) (Wozniak et al., 2000; Chang et al., 2013). Toch bleef de exacte oorzaak van de aandoening gedurende lange tijd onopgehelderd en de diagnose van IBD was lange tijd gelimiteerd tot het aantonen van de karakteristieke inclusies in cytologische preparaten afkomstig van aspiraten, histologische preparaten van organen en bloeduitstrijkjes. Het was op dat ogenblik echter wel reeds duidelijk dat inclusies bij boa's vaak gedissemineerd voorkwamen in de epitheliale cellen van de meeste organen, terwijl de inclusies bij pythons vaak enkel aangetroffen werden in neuronen van het CZS (Chang en Jacobson, 2010).

Initieel werden retrovirussen naar voor geschoven als kandidaat etiologische agentia omdat C-type retrovirale partikels in geïnfecteerde cellen werden gezien en reverse-transcriptase-activiteit werd aangetoond

in plasma van met IBD geïnfecteerde slangen alsook in supernatant van cellijnen afkomstig van positief testende dieren; een causaal verband kon echter niet aangetoond worden (Jacobson et al., 2001; Huber et al., 2002). Bij de start van dit decennium kwam er een doorbraak in de opheldering betreffende de oorzaak van BIBD. Via “next-generation sequencing” (NGS) werd het compleet genoom van twee arena-achtige virussen (golden gate virus (GGV) en California academy of science Virus (CASV)) bepaald na isolatie uit weefsels verzameld bij BIBD-positieve boa's (Stenglein et al., 2012). Bovendien werden de postulaten van Koch in vitro aangetoond op basis van isolatie van het CASV na inoculatie van een primaire cellijn. Ook werd het nucleocapside eiwit van een arenavirus-achtig virus in BIBD-inclusies aangetoond via immunohistochemie (IHC) en werden er RT-PCR-primers ontwikkeld om het virus kwantitatief aan te tonen in bloedstalen en weefsels afkomstig van BIBD-positieve dieren (Chang et al., 2016; Stenglein et al., 2012). Op basis van NGS, immunofluorescentie (IF), IHC en elektronenmicroscopie werden nadien nog enkele arena-achtige virussen geïsoleerd bij met BIBD geïnfecteerde dieren (Bodewes et al., 2013; Hetzel et al., 2013). Arena-achtige virussen afkomstig van BIBD-positieve slangen worden gegroepeerd als de “boïd IBD-associated viruses” (BIBDAVs). Door middel van de ontwikkeling van een competitieve ELISA waarmee anti-arenavirus-antistoffen kunnen aangetoond worden bij BIBD-positieve dieren en door het op punt stellen van verschillende RT-PCR-protocollen om reptarenavirussen te detecteren in een grote variatie van stalen, werd aangetoond dat een uitgebreide genetische variatie bestaat onder de BIBDAVs (Bodewes et al., 2013; Hepojoki et al., 2015b; Korzyukov et al., 2016). Dit heeft tot gevolg dat vals-negatieve resultaten kunnen bekomen worden voor een bepaald reptarenavirus afhankelijk van het gebruikte RT-PCR-protocol.

Arenavirussen zijn enkelvoudige RNA-virussen en de familie Arenaviridae bestaat momenteel uit drie genera: het genus *Mammarenavirus* dat zoogdieren infecteert en de genera *Reptarenavirus* en *Hartmannivirus* die voorkomen bij slangen (Stenglein et al., 2017). Op dit ogenblik worden er vijf species opgenomen in het genus *Reptarenavirus*: golden reptarenavirus (GOGV, voorheen GGV), California reptarenavirus (voorheen: California academy of science virus (CASV)), Rotterdam reptarenavirus (ROUTV, voorheen Av NL B3, en UHV), ordinary reptarenavirus (TSMV-2) en Giessen reptarenavirus (UGV 1-3).

Stenglein et al. (2017) voerden experimentele infectiestudies uit om het oorzakelijk verband tussen reptarenavirusinfectie en IBD aan te tonen en slaagden erin om de postulaten van Koch ook in vivo aan te tonen voor reptarenavirussen. Na experimentele infectie van koningspythons (*Python regius*) en boa constrictors met het GGV trad er snel na inoculatie progressieve en ernstige neurologische ziekte op bij

de pythons, terwijl de boa constrictors gedurende een twee maanden durende opvolgingsperiode geen symptomen ontwikkelden. Bij de boa's werden wel virale infectie en het veralgemeende voorkomen van grote aantallen inclusies gedetecteerd, maar er werden geen histopathologische letsels vastgesteld ter hoogte van de organen waarvan de cellen virale inclusies bevatten. Bij de geïnoculeerde pythons werden er enkel in het CZS beperkte aantallen inclusies aangetroffen. Op histopathologisch onderzoek werd echter wel inflammatie aangetoond ter hoogte van het hersenweefsel waaraan de geobserveerde CZS-symptomen konden gelinkt worden.

Hoewel IBD en gerelateerde ziekte initieel voornamelijk bij pythons werden vastgesteld, lijkt er sinds het begin van de jaren negentig van de vorige eeuw een epidemiologische shift opgetreden te zijn, waarbij BIBD sindsdien vaker bij boa constrictors dan bij pythons vastgesteld wordt (Chang en Jacobson, 2010). Een opvallende bevinding is de lage of veelal afwezige morbiditeit bij pythons in gemengde slangencollecties met een groot aantal subklinisch BIBD-positieve boa's en hevige, persistente bloedmijtinfectie, zoals werd vastgesteld in een recente, groot-schalige prevalentiestudie van Simard et al. (2019). Verder onderzoek is noodzakelijk om deze evolutie en bevindingen te verklaren en de eventuele opbouw van populatie-immuniteit bij bepaalde slangentaxa te bestuderen. Een verkeerde interpretatie van vaststellingen bij met BIBD geïnfecteerde slangen ten gevolge van het oorspronkelijk enigmatische aspect van de aandoening en het ontbreken van hoog sensitieve en specifieke diagnostische testen gedurende de eerste decennia na de eerste beschrijving van BIBD kunnen eveneens een verklaring vormen voor de schijnbaar opgetreden epidemiologische shift.

PATHOGENESE, PATHOLOGIE EN SYMPTOMEN

De exacte pathogenese van BIBD is nog steeds niet opgehelderd. Overdracht zou voornamelijk via rechtstreeks en onrechtstreeks contact optreden hoewel reptarenavirussen vermoedelijk een korte overlevings-tijd in de omgeving kennen. Zowel in de mondholte als de mest en urine en zelfs ter hoogte van de huid van geïnfecteerde slangen werden hoge virale loads aangetroffen (Stenglein et al., 2017). Recent werd er eveneens verticale transmissie van BIBD bij boa constrictors aangetoond (Keller et al., 2017). Ook bloedzuigende vectoren, onder andere de bij in gevangenschap gehouden slangencollecties vaak voorkomende mijt, *Ophionyssus natricis*, zouden een rol spelen in de transmissie alhoewel er hiervoor nog geen sluitend bewijs werd geleverd (Hepojoki et al., 2015a).

De incubatieperiode voor het verschijnen van de typische intracytoplasmatische inclusies lijkt variabel te zijn. Na experimentele infectie van boa's en

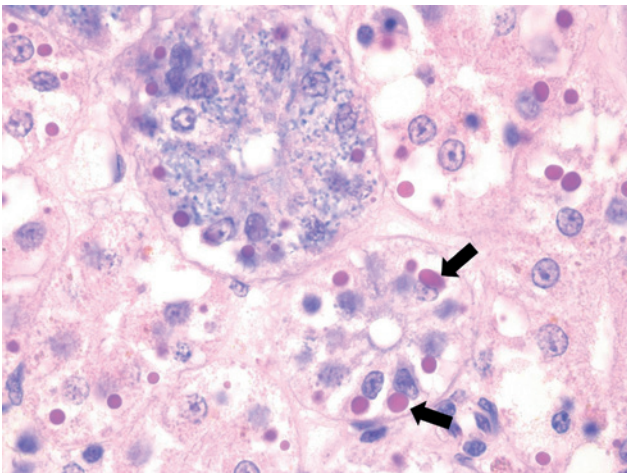
pythons werden BIBD-inclusies op het einde van de observatieperiode bij boa constrictors aangetroffen (Stenglein et al., 2017). In de studie waarbij verticale transmissie van BIBD bij boa constrictors werd bestudeerd, kon viraal RNA reeds bij embryo's aangetoond worden, terwijl inclusies bij neonatale boa's pas na twee maanden konden gedetecteerd worden (Keller et al., 2017). Volgens de auteurs treedt verticale transmissie niet routinematig op (T. Hellebuyck, persoonlijke mededeling, 2019). Bij nakomelingen van een BIBD-positief ouderpaar werden gemiddeld zes weken na de geboorte echter wel inclusies in circulerende lymfocyten vastgesteld. Opvallend was dat de inclusies zich slechts bij 50 % van de nakomelingen ontwikkelden en ernstige en fatale CZS-symptomen eveneens enkel bij de BIBD-positieve nakomelingen optraden nog voor de inclusies in de perifere witte bloedcelfractie konden gedetecteerd worden.

Sinds de eerste rapportering van BIBD wordt een hele reeks symptomen, zoals stomatitis, pneumonie, dermatitis, regurgitatie, lymfoproliferatieve aandoeningen en neurologische symptomen routinematig geassocieerd met BIBD-infectie (Schumacher et al., 1994; Chang en Jacobson, 2010). Het kan niet genoeg benadrukt worden dat er met grote voorzichtigheid dient omgegaan te worden met het correleren van een ziektebeeld met het detecteren van BIBD-inclusies en/of reptarenavirus RNA bij boa's en pythons. Voornamelijk wat betreft specifieke symptomen dient in beschouwing genomen te worden dat veel BIBD-positieve dieren latent en subklinisch geïnfecteerd zijn en de vastgestelde symptomen bij deze dieren vaak toegewezen kunnen worden aan simultaan voorkomende ziekte (Simard et al., 2019). Een correcte, allesomvattende diagnostische aanpak is aldus van het grootste belang om het vormen van verkeerde conclusies te vermijden. Anderzijds bestaat er een aanzienlijke kans dat veel van de symptomen die bij BIBD-positieve slangen gezien worden comorbiditeiten zijn die optreden of gefaciliteerd worden ten gevolge van lokale of systemische immunosuppressie die het gevolg is van infectie met reptarenavirussen (Hyndman et al., 2019; Simard et al., 2019). Verder onderzoek is noodzakelijk om de pathogenese van BIBD op te helderen en te linken aan ziektebeelden die geobserveerd worden bij geïnfecteerde slangen. Na een correcte diagnose van de onderliggende oorzaak verdwijnen veel comorbiditeiten bij het instellen van een gepaste therapie. Omwille van aanhoudende immunosuppressie bestaat er bij persistent met BIBD geïnfecteerde dieren echter een grote kans op recidieven, ook voor de meest banale aandoeningen.

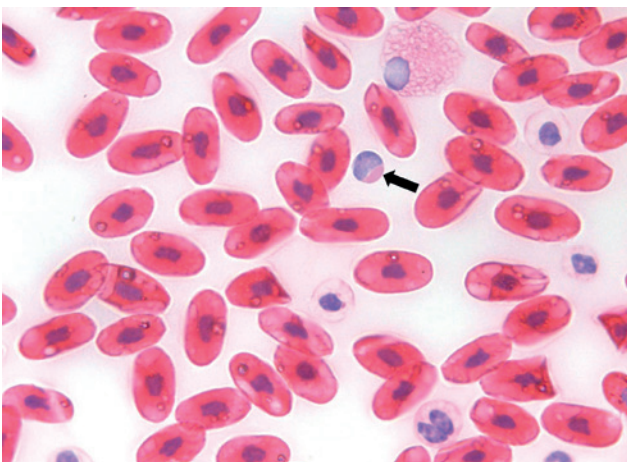
Klassiek worden neurologische symptomen ten gevolge van infectie van het centrale zenuwstelsel als het meest karakteristiek beschouwd voor klinische BIBD-infectie. Deze symptomen uiten zich in de vorm van milde tot uitgesproken incoördinatie, verlies van de omkeerreflex, tremoren en opisthotonus (Schumacher et al., 1994; Stenglein et al., 2017) (Figuur 1).



Figuur 1. “Head-tilt” en afwezige omkeerreflex bij een koningspython (*Python regius*) met “booid inclusion body disease”. Histologisch onderzoek van het hersenweefsel van deze slang toonde non-suppuratieve meningo-encefalitis en eosinofiele, intracytoplasmatische inclusies in neuronen aan.



Figuur 2. Karakteristieke eosinofiele, intracytoplasmatische BIBD-inclusies (pijltjes) in nefrocyten van een boa constrictor (*Boa constrictor*). Hematoxyline- en eosinekleuring, 1000x.



Figuur 3. Karakteristieke eosinofiele, intracytoplasmatische BIBD-inclusie (pijltjes) in een lymfocyt van een boa constrictor (*Boa constrictor*). Bloeduitstrijkje, hematoxyline- en eosinekleuring, 1000x.

Bij pythons worden occasioneel parese en paralyse vastgesteld van het distale deel van het lichaam met distentie van het caudale coeloom ten gevolge van paralytische ileus en ophoping van eindmest en urine (T. Hellebuyck, persoonlijke mededeling, 2019). Histopathologisch worden bij boa's dikwijls BIBD-inclusies aangetroffen in de cellen van het CZS, terwijl deze bij pythons meestal in beperkte mate aanwezig zijn of zelfs niet gevonden worden. Zowel bij boa's als pythons met CZS-symptomen wordt in de meeste gevallen echter wel non-suppuratieve meningo-encefalitis (NSME) vastgesteld. Indien NSME wordt vastgesteld zonder de aanwezigheid van BIBD-inclusies is het van het grootste belang om eveneens reptarenavirus RT-PCR uit te voeren op hersenweefsel.

Symptomen die een significant maar onrechtstreeks verband met BIBD-infectie lijken te vertonen, zijn neoplastische aandoeningen, vertebrale osteomyelitis, dermatitis en recidiverende respiratoire infecties (Simard et al., 2019). Zoals hoger beschreven kan er voor deze aandoeningen geen primair causaal verband met BIBD aangetoond worden, maar dienen ze beschouwd te worden als comorbiditeiten die optreden ten gevolge van viraal geïnduceerde immunosuppressie. Voornamelijk lymfoproliferatieve neoplastische aandoeningen werden reeds beschreven bij BIBD-positieve boa's (Hellebuyck et al., 2015; Schillinger et al., 2011; 2014). Zowel RNA van een reptarenavirus als BIBD-inclusies werden reeds aangetoond in neoplastische cellen van een odontogeen fibromyxoma bij een boa constrictor door Hellebuyck et al. (2015). De auteurs opperden ook in dit geval dat er geen primair verband bestond tussen de neoplasie en de virale infectie, maar het virus wel een tropisme vertoonde voor de snel delende neoplastische cellen.

Relatief vaak voorkomende aandoeningen die vastgesteld worden bij BIBD-positieve boa's zijn vertebrale discospondylitis en osteomyelitis (Simard et al., 2019). Meestal zijn de caudale thoracale of lumbale wervels aangetast met uiteindelijk het ontstaan van uitvalsverschijnselen ter hoogte van de caudale lichaamshelft tot gevolg. Veelal zijn harde, nodulaire letsels te zien of zijn deze palpeerbaar ter hoogte van de dorsale middenlijn ten gevolge van beenderige proliferatie van de onderliggende aangetaste wervels. In sommige gevallen worden eveneens orgaanlocalisaties ter hoogte van de lever en gonaden gezien. Uitvalsverschijnselen worden veroorzaakt door stenose van het wervelkanaal met ruggenmergcompressie tot gevolg. Bijna in alle gevallen worden *Salmonella* spp. geïsoleerd uit de wervelletsels. Reptielen worden beschouwd als reservoirs van veelal zoönotische *Salmonella* spp. (Pasmans et al., 2008). Opvallend is dat *Salmonella* spp. die met dit letsel geassocieerd worden, minder frequent intestinale kolonisatie lijken te vertonen en dus een extra-intestinaal tropisme lijken te hebben voor bot. Bij aangetaste, BIBD-positieve dieren wordt vermoed dat immunosuppressie het ontstaan van bacteriëmie faciliteert en aanleiding geeft

tot kolonisatie van de intervertebrale ruimtes met het ontstaan van vertebrale osteomyelitis tot gevolg. Volgens de auteurs worden klachten in deze gevallen meestal in het eindstadium opgemerkt en bijgevolg aangeboden in een stadium waar antimicrobiële behandeling inefficiënt is omwille van de reeds aanwezige botpathologie en de onomkeerbare geassocieerde neurologische schade.

DIAGNOSTIEK

De correcte diagnose van BIBD is belangrijk op het niveau van het individuele dier. Elke boa of python die met ziekte tekenen wordt aangeboden in de praktijk wordt het best routinematig getest voor BIBD. Dit vormt eveneens een belangrijk onderdeel van ingangscorolles die bij grotere collecties dienen uitgevoerd te worden.

De diagnose van BIBD berust enerzijds op het aantonen van de karakteristieke eosinofiele of amfofiele, intracytoplasmatische inclusies die in epitheliale cellen van de meeste organen en in neuronen van het centrale zenuwstelsel kunnen aangetroffen worden en anderzijds op het aantonen van reptarenavirus-RNA (Hyndman et al., 2019; Simard et al., 2019). Voornamelijk bij boa's kunnen inclusies relatief vlot aangetoond worden (Simard et al., 2019). Alhoewel het onderzoeken van histologische secties van leverweefsel vroeger als de gouden standaard werd beschouwd voor wat betreft de ante-mortemdiagnostiek van IBD, is het ondertussen bekend dat het opsporen van inclusies in de witte bloedcelfractie (voornamelijk lymfocyten) op bloeduitstrijkjes of buffy-coatuitstrijkjes erg betrouwbaar is, tenminste voor boa's (Simard et al., 2019). Hematoxyline- en eosinekleuring (H&E) is de meest aangewezen kleuring om de inclusies ondubbelzinnig te kunnen identificeren in bloed- en weefselstalen. Er blijkt een sterke correlatie te bestaan tussen het aantonen van de inclusies in buffy-coatuitstrijkjes en bloeduitstrijkjes (Simard et al., 2019). De meerwaarde van buffy-coatuitstrijkjes beperkt zich aldus tot het concentreren van witte bloedcellen, waardoor een gemiddeld kleiner aantal microscopische velden dient gescreend te worden om de aanwezigheid van inclusies in de perifere witte bloedcellen aan te tonen of uit te sluiten. Ook tussen uitstrijkjes en histologisch onderzoek van orgaancoupees blijkt een uitstekende correlatie te bestaan (Figuur 2 en 3). Op basis van langetermijnopvolging en het repetitief testen van BIBD-positieve slangen werd door de auteurs vastgesteld dat het voorkomen van transiënte infectie erg onwaarschijnlijk is en eens inclusies worden gedetecteerd bij een slang deze bij elke herhaling van inclusietesten consistente resultaten bekomen worden.

Het opsporen van inclusies in bloed- of orgaanstalen dient steeds gecombineerd te worden met het aantonen van reptarenavirusinfectie om de zekerheidsdiagnose van BIBD te stellen. Een aanzienlijk aantal commerciële labo's biedt op dit ogenblik diag-

nostische testen aan voor het aantonen van BIBD/reptarenavirusinfectie. In de meeste gevallen wordt RT-PCR toegepast op bloed- of orgaanstalen, excreta en/of tonsillaire swabs. Valsnegatieve RT-PCR-resultaten kunnen veroorzaakt worden door staalname tijdens een niet-viremische fase, in geval van transiënte infectie of op een ogenblik dat er geen virus uitgescheiden wordt zoals ook wordt vastgesteld bij zoogdieren met mammarenavirusinfectie (Hyndman et al., 2019). Anderzijds is het eveneens mogelijk dat uitgesproken genetische diversiteit binnen het *Reptarenavirus*-genus verantwoordelijk is voor vals-negatieve resultaten. Afhankelijk van het gebruikte RT-PCR-protocol is het dus mogelijk dat bepaalde reptarenavirussen aan detectie ontsnappen. Idealiter zouden stalen in die gevallen aan een combinatie van RT-PCR-protocollen of aan een "hemi-nested" RT-PCR dienen onderworpen te worden (Bodewes et al., 2013; Stenglein et al., 2017). Bij sommige slangen worden IBD-inclusies aangetroffen terwijl ze negatief testen voor reptarenavirussen via RT-PCR. Het is mogelijk dat sterk gelijkende inclusies eveneens ontstaan ten gevolge van infecties met andere agentia, waarvan het bestaan misschien nog niet bekend is, en zelfs ten gevolge van metabole aandoeningen of stapelingsziekten met de vorming van eiwitrijke, niet-infectieuze inclusies tot gevolg (Chang en Jacobson, 2010). Andere methoden, zoals NGS, IF, IHC en ELISA, laten toe infectie met een grote diversiteit aan reptarenavirussen te detecteren, maar zijn niet inzetbaar als routine diagnostische methoden.

In tegenstelling tot boa's is het cruciaal om rekening te houden met de specifieke uitdagingen die de diagnostiek van BIBD bij pythonsoorten stelt. Bij in gevangenschap gehouden boa constrictors werden prevalenties tot 37,3 % vastgesteld voor wat betreft het voorkomen van BIBD in Belgische slangencollecties (Simard et al., 2019). Het overgrote deel van deze dieren vertoont geen symptomen op het moment van diagnose of vertonen symptomen waarvoor geen causaal verband met BIBD kan aangetoond worden. Bij zowel asymptomatische als klinisch aangetaste pythons worden zelden inclusies aangetoond in circulerende witte bloedcellen of in epitheliale cellen van histologische secties van viscerale organen (Hyndman et al., 2019; Simard et al., 2019). Zelfs ter hoogte van het centrale zenuwstelsel zijn inclusies dikwijls beperkt tot neuronen en dikwijls slechts in beperkte aantallen aanwezig. Vaak wordt er bij reptarenavirus-positieve pythons met CZS-symptomen wel NSME vastgesteld op basis van histologisch onderzoek. RT-PCR op tonsillaire swabs of bloed- en orgaanbiopten lijkt dus het meest aangewezen om reptarenavirusinfectie ante mortem te testen bij pythons. Post mortem vormt RT-PCR op hersenweefsel waarschijnlijk de meest betrouwbare methode om reptarenavirus aan te tonen of uit te sluiten bij pythons.

Voor niet-viremische slangen, slangen waarbij op het ogenblik van staalname geen uitscheiding plaatsvindt en voornamelijk voor pythons waarbij zowel

Tabel 1. Belangrijkste aandachtspunten met betrekking tot “boid inclusion body disease” bij boa’s en pythons.

	Boa’s	Pythons
Prevalentie	Hoog (tot bijna 40 %)	Onbekend
Overdracht	In hoofdzaak rechtstreeks, verticale transmissie werd aangetoond	Verticale transmissie werd nog niet beschreven maar treedt waarschijnlijk eveneens op
Ziekteverloop	Een groot aantal BIBD-positieve dieren vertoont latente, subklinische infectie	Er wordt aangenomen dat er zich relatief snel na infectie progressieve en in hoofdzaak neurologische ziekte ontwikkelt. Er is echter meer en meer bewijs dat ook pythons frequent latente infectie kunnen vertonen
Symptomen	Subklinisch, centraal zenuwstelsel (CZS) symptomen, lymfoproliferatieve aandoeningen, recidiverende respiratoire infectie, dermatitis en vertebrale osteomyelitis	Subklinisch of CZS-symptomen
Diagnostiek	BIBD-inclusies in perifere witte bloedcellen. Reptarenavirus RT-PCR op bloedstaal of weefselstaal	BIBD-inclusies vaak gelimiteerd tot CZS of afwezig. Herhaaldelijk RT-PCR op bloedstalen of orgaanbiopten noodzakelijk. Post mortem: RT-PCR op hersenweefsel

viraal RNA als inclusies dikwijls gelimiteerd zijn tot neuronen in het centrale zenuwstelsel, zou het aantonen van antistoffen een alternatief kunnen zijn om contact met reptarenavirus op te sporen (Korzyukov et al., 2016). Ook in dit geval kunnen valsnegatieve antistoftesten niet uitgesloten worden wanneer er geen affiniteit is van de gebruikte merkers met het betrokken arenavirus en in geval van recente infectie; het is ook mogelijk dat er antistoffen aangetoond worden terwijl virale infectie reeds geëlimineerd werd op het ogenblik van het uitvoeren van de serologische test.

HET MANAGEMENT VAN BIBD IN SLANGENCOLLECTIES

Rekening houdend met het wijdverspreid voorkomen van BIBD bij boa’s en pythons in gevangenschap vormt screening van deze aandoening een belangrijk onderdeel van de ingangscntroles bij de introductie van nieuw aangekochte boa’s of pythons in slangencollecties (Pasmans et al., 2008). In sommige landen zijn hobbyisten en kwekers zich goed bewust van het voorkomen van deze aandoening en eisen ze dat boa’s of pythons reeds getest worden voor BIBD voorafgaand aan de aankoop of overdracht van de slang.

Aangezien de exacte incubatieperiode van reptarenavirusinfectie of het detecteerbaar worden van BIBD-inclusies niet bekend is, wordt een quarantaineperiode van minimum twee maanden aangera-

den. Idealiter dienen er testen bij de start en het einde van de quarantaineperiode uitgevoerd te worden.

Binnen bestaande collecties kan er steekproefsgewijs of op het niveau van individuele dieren routinematig gescreend worden. Voornamelijk voor pythons is het noodzakelijk herhaaldelijk te testen rekening houdend met het veelal beperkt en gelokaliseerd voorkomen van BIBD-inclusies en reptarenavirus-RNA ter hoogte van het CZS (Hyndman et al., 2019; Simard et al., 2019). Op basis van de resultaten van een dergelijke screening kunnen positief van negatief testende dieren binnen een collectie gescheiden worden of kunnen meer drastische maatregelen in combinatie met ingangstesten en quarantaine van nieuwe dieren tot BIBD-negatief testende collecties leiden. Als preventieve maatregel en rekening houdend met de reeds aangetoonde verticale transmissie kan er eveneens beslist worden om niet met geïnfecteerde dieren te kweken.

Insleep van ectoparasitaire infectie dient steeds vermeden te worden of adequaat bestreden te worden aangezien voornamelijk bloedzuigende vectoren een potentiële rol in de transmissie van BIBD-infectie kunnen spelen.

CONCLUSIE

Op basis van de huidige kennis omtrent BIBD kunnen de volgende aandachtspunten en conclusies geformuleerd worden (Tabel 1):

- BIBD komt wijdverspreid voor bij boa's en pythons. Voornamelijk bij in gevangenschap gehouden boa constrictors worden hoge prevalenties van persistent, subklinisch geïnfecteerde dieren vastgesteld
- rechtstreekse en onrechtstreekse overdracht via excreta of overdracht via bloedzuigende vectoren vormen waarschijnlijk de belangrijkste route tot transmissie. Verticale transmissie van BIBD werd reeds aangetoond bij boa constrictors
- het opsporen van BIBD-inclusies in H&E-gekleurde bloeduitstrijkjes bij boa constrictors vormt een erg betrouwbare methode om infectie aan te tonen aangezien er een uitstekende correlatie is met RT-PCR-testen voor reptarenavirussen
- het aantonen van BIBD-infectie bij pythons is uitdagend. Meestal is infectie beperkt tot het CZS en worden BIBD-inclusies niet aangetroffen. Reptarenavirus RT-PCR op een bloedstaal of orgaanbiopt is het meest aangewezen als diagnostische methode ante mortem. Het uitvoeren van RT-PCR en histologisch onderzoek op hersenweefsel zijn het meest betrouwbaar bij pythons om de diagnose van BIBD te stellen.
- bij de meeste BIBD-positieve slangen worden geen symptomen gezien op korte tot middellange termijn.
- boa's of pythons met neurologische symptomen dienen steeds getest te worden op BIBD-infectie. Neoplastische aandoeningen, voornamelijk lymfoproliferatief, vertebrale osteomyelitis en recidiverende respiratoire problemen en dermatitis zijn vaak voorkomende comorbiditeiten bij BIBD-positieve boa constrictors en worden vermoedelijk gefaciliteerd door reptarenavirusgeïnduceerde immunosuppressie

REFERENTIES

- Bodewes, R., Kik, M.J., Schapendonck, C.M., Haagmans, B.L., Smits, S.L., Osterhaus, A.D. (2013). Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *Journal of General Virology* 94, 1206-1210.
- Chang, L-W., Jacobson, E.R. (2010). Inclusion body disease, a worldwide infectious disease of boid snakes: a review. *Journal of Exotic Pet Medicine* 19, 216-225.
- Chang, L-W., Fu, A., Wozniak, E., Chow, M., Duke, D.G., Green, L., Kelley, K., Hernandez, J.A., Jacobson, E.R. (2013). Immunohistochemical detection of a unique protein within cells of snakes having inclusion body disease, a world-wide disease seen in members of the families Boidae and Pythonidae. *PLoS ONE* 8, e82916.
- Chang, L., Stenglein, M.D., Hernandez, J.A., DeRisi, J.L., Jacobson, E.R. (2016). Detection and prevalence of boid inclusion body disease in collections of boas and pythons using immunological assays. *The Veterinary Journal* 218, 13-18.
- Hellebuyck, T., Pasmans, F., Ducatelle, R., Saey, V., Martel, A. (2015). Detection of arenavirus in a peripheral odontogenic fibromyxoma in a red tail boa (*Boa constrictor constrictor*) with inclusion body disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 27, 245-248.
- Hepojoki, J., Kipar, A., Korzyukov, Y., Bell-Sakyi, L., Valapalahti, O., Hetzel, U. (2015a). Replication of boid inclusion body disease-associated arenaviruses is temperature sensitive in both boid and mammalian cells. *Journal of Virology* 89, 1119-1128.
- Hepojoki, J., Salmenperä, P., Sironen, T., Hetzel, U., Korzyukov, Y., Kipar, A., Valapalahti, O. (2015b). Arenavirus coinfections are common in snakes with boid inclusion body disease. *Journal of Virology* 89, 8657-8660.
- Hetzel, U., Sironen, T., Laurinmäki, P., Liljeroos, L., Patjas, A., Henttonen, H., Vaheri, A., Artelt, A., Kipar, A., Butcher, S.J., et al. (2013). Isolation, identification, and characterization of novel arenaviruses, the etiological agents of boid inclusion body disease. *Journal of Virology* 87, 10918-10935.
- Huber, J.B., Böni, J., Hatt, J.M., Soldati, G., Lutz, H., Schüpbach, J. (2002). Identification and characterization of two closely related unclassifiable endogenous retroviruses in pythons (*Python molurus* and *Python curtus*). *Journal of Virology* 76, 7607-7615.
- Hyndman, T.H., Marschang, R.E., Bruce, M., Clark, P., Vitali, S.D. (2019). Reptarenaviruses in apparently healthy snakes in an Australian zoological collection. *Australian Veterinary Journal* 97, 93-99.
- Jacobson, E.R., Oros, J., Tucker, S.J., Pollock, D.P., Kelley, K.L., Munn, R.J., Lock, B.A., Mergia, A., Yamamoto, J.K. (2001). Partial characterization of retroviruses from boid snakes with inclusion body disease. *American Journal of Veterinary Research* 62, 217-224.
- Keller, S., Hetzel, U., Sironen, T., Korzyukov, Y., Vapalahti, O., Kipar, A., Hepojoki, J. (2017). Co-infecting reptarenaviruses can be vertically transmitted in *Boa constrictor*. *PLoS Pathogens* 13, e1006179.
- Korzyukov, Y., Hetzel, U., Kipar, A., Vapalahti, O., Hepojoki, J. (2016). Generation of anti-boa immunoglobulin antibodies for serodiagnostic applications, and their use to detect anti-reptarenavirus antibodies in *Boa Constrictor*. *PLoS ONE* 11, e0158417.
- Pasmans, F., Blahak, S., Martel, A., Pantchev, N. (2008). Introducing reptiles into a captive collection: the role of the veterinarian. *Veterinary Journal* 175, 53-68.
- Schillinger, L., Selleri, P., Frye, F.L. (2011). Lymphoblastic lymphoma and leukemic blood profile in a red-tailed boa. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 159-162.
- Schillinger, L., Rossfelder, A., Bonwitt, J., Di Girolamo, N., Rival, F., Gandar, F., Selleri, P., Nicolier, A. (2014). Antemortem diagnosis of multicentric lymphoblastic lymphoma, lymphoid leukemia, and inclusion body disease in a boa constrictor. *Journal of Herpetological Medicine and Surgery* 24, 11-19.
- Schumacher, J., Jacobson, E.R., Homer, B.L., Gaskin, J.M. (1994). Inclusion body disease in boid snakes. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 25, 511-524.
- Simard, J., Marschang, R.E., Leineweber, C., Hellebuyck, T. (2019). Prevalence, clinical importance and long term follow-up of inclusion body disease in captive collections of boid snakes. In: *Avian Herpetological and Exotic Mammal Medicine*. Abstracts presented at the 4th International Conference on Avian Herpetological and Exotic Mammal Medicine (ICARE 2019).

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. *mBio* 3, e00180-12.

Stenglein, M.D., Jacobson, E.R., Chang, L-W., Sanders, C., Hawkins, M.G., Guzman, D.S-M., Drazenovich, T., Dunker, F. Kamaka, E.K., Fischer D., et al. (2015). Widespread recombination, reassortment and transmission of unbalanced compound viral genotypes in natural arenavirus infections. *PLoS Pathogens* 11, e1004900.

Stenglein, M.D., Guzman, D.S-M., Garcia, V.E., Layton, M.L., Hoon-Hanks, L.L., Boback, S.M., Keel, M.K., Drazenovich, T., Hawkins, M.G., DeRisi, J.L. (2017). Differential disease susceptibilities in experimentally reptarenavirus-infected boa constrictors and ball pythons. *Journal of Virology* 91, e00451-17.

Wozniak, E., McBride, J., DeNardo, D., Tarara, R., Wong, V., Osburn, B. (2000). Isolation and characterization of an antigenically distinct 68- kd Protein from nonviral intracytoplasmic inclusions in boa constrictors chronically infected with the inclusion body disease virus (IBDV: Retroviridae). *Veterinary Pathology* 37, 449-459.

Vind de juiste werker voor je bedrijf

www.mediaservice.be

Plaats je
personeelsadvertentie in
Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift
en krijg 15% korting.



Mediaservice 
gericht adverteren