

4. Diskussion

Leider fehlten Informationen über genaue Herkunft, Population, Alter bei Fang, Haltung und Ernährung. Daher und aufgrund der kleinen Stichprobenzahl und der nicht auszuschließenden Vorauswahl durch die Probenbeschaffung können die folgenden Ausführungen können nur strikt für das untersuchte Material gelten.

4.1. Häufigkeit

Von den 84 untersuchten Schildkröten waren insgesamt 46 (54,7%) mit *Myxosporea* infiziert. Das sind weit mehr, als erwartet. Bei den Untersuchungen von MUTSCHMANN (2003), der 265 Reptilien untersuchte, erwiesen sich nur 18 (6,8%) als *Myxosporea*- positiv. Alle 18 Tiere waren Schildkröten.

4.2. Myxidium- Spezies

Es fiel sehr schwer, die gefundenen Daten den bisher in der Literatur beschriebenen *Myxidium*-Spezies zuzuordnen, da sich die Morphologie der verschiedenen *Myxidium*- Sporen unter dem Lichtmikroskop sehr ähnelt (siehe Abb. 5-8) und bisher fast ausschließlich ein Nachweis nur entweder in Leber /Galle oder in Nieren/ Urin stattgefunden hat. Hier wurden zum ersten Mal sehr viele betroffene Tiere mit einem gleichzeitigen Befall von Galle, Leber, Nieren und Urin gefunden. Es konnte erstmalig bei Schildkröten ein Befall mit zwei verschiedenen *Myxidium*- Spezies nachgewiesen werden, wobei dieses Phänomen bei Fischen schon mehrfach beschrieben wurde (SHULMAN, 1990, YASUDA *et al.*, 2002).

Hinzu kommt, dass Sporenlänge, -breite und Polkapselmaße offensichtlich größeren Schwankungen unterliegen, als in der Literatur angegeben bzw. dass die Literaturwerte z.B. von *Myxidium americanum* und *Myxidium chelonarum* so dicht beieinander liegen, dass eine Unterscheidung aufgrund dieser Kriterien nicht möglich ist.

Damit bleiben als Möglichkeit der Differenzierung zwischen den Spezies nur die Herkunft der untersuchten Proben, Zahl der Polfadenwindungen und Zahl und Verlauf der Schalenstreifungen der Sporen, da sich auch die vegetativen Stadien in der Beschreibung sehr ähneln.

Des weiteren ist zu beachten, dass die Sporenmorphologie bezüglich Sporengröße und -gestalt, Anzahl, Lage und Größe der Polkapseln, Klappenanzahl und -größe sowie Vorhandensein und Ausprägung von Kaudalfortsätzen sehr variieren kann. Das könnte fälschlicherweise zu einer Einordnung in andere Spezies, Gattung, Familie oder sogar Ordnung führen.

Als Beispiel seien hier die atypischen Formen von *Ceratomyxa truncata* genannt, die durch die Zunahme der Klappen von zwei auf vier leicht in die Ordnung Mulivalvulida eingeordnet werden könnten (SHULMAN, 1990).

JOHNSON (1969 b) beschreibt atypische Sporenformen bei *Myxidium chelonarum*, in denen anstelle von zwei Polkapseln auch nur eine einzige, drei oder sogar vier Polarkapseln vorkommen können.

Myxidium americanum

Die Sporen von *Myxidium americanum* stellten sich in dieser Untersuchung als etwas variabler in der Größe dar, als von KUDO (1919) angegeben. Der Autor gab die Sporenlänge mit 15-16 μm an, während hier Sporen im Bereich von $17,1 \pm 1,8 \mu\text{m}$ ($14,8 \mu\text{m}$ - $20,8 \mu\text{m}$) Länge und $5,4 \pm 1,0 \mu\text{m}$ ($4,3 \mu\text{m}$ - $6,3 \mu\text{m}$) Breite ($n=17$) gefunden wurden. Die Polkapseln wiesen eine Länge von $5,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ($4,9 \mu\text{m}$ - $6,9 \mu\text{m}$) auf, wohingegen in der Erstbeschreibung eine Länge von $4 \mu\text{m}$ angegeben wurde.

Als weiteren Unterschied zur Erstbeschreibung stellte sich die Zahl der Windungen des Polarfilaments dar, da diese in der hier vorliegenden Untersuchung teilweise auch über vier Windungen zu verfügen schienen.

Myxidium chelonarum

Auch die Sporen dieser Spezies scheinen eine breitere Varianz in der Länge zu zeigen, als von JOHNSON (1969 a, b) angegeben wurde. Der Autor beschrieb die Sporenmaße mit $12,5 \mu\text{m}$ - $16 \mu\text{m}$ Länge, die Sporenbreite mit $3 \mu\text{m}$ - $5 \mu\text{m}$, hier wurden jedoch Sporendimensionen von $10,0$ - $18,0 \mu\text{m}$ ($14,8 \pm 1,7 \mu\text{m}$, $n=131$) mal $3,2 \mu\text{m}$ - $6,1 \mu\text{m}$ ($4,7 \pm 0,6 \mu\text{m}$, $n=76$) gefunden. Die Polkapseln wiesen eine Länge von $4,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$ ($3,0 \mu\text{m}$ - $6,3 \mu\text{m}$, $n=120$) auf, was der Erstbeschreibung mit $2,5$ - $5 \mu\text{m}$ nahe kommt.

Übereinstimmend mit dem Autor fand sich diese Spezies bei vielen verschiedenen Schildkrötenarten und auch in vielen verschiedenen Organen. Entgegen der Erstbeschreibung scheinen *Myxidium chelonarum*- Sporen jedoch über Längsstreifen zu verfügen. Der Eindruck einer schrägen Streifung kann durch die Lage der Spore im Raum entstehen.

Myxidium rhinoclemmysi sp. nov.

Die Erstbeschreibung dieser Spezies durch MUTSCHMANN und NEUBERT ist in Vorbereitung und folgt den von LOM und ARTHUR (1989) vorgeschlagenen Leitlinien.

Bei Schildkröten kommen nach bisherigem Erkenntnisstand nur folgende Myxosporaea- Spezies vor: *Myxidium americanum*, *M. chelonarum*, *M. danilewskyi*, *M. mackiei* und *Zschokkella lissemysi* (KUDO, 1919, JOHNSON, 1969 a, b, LAVERAN, 1897, BOSANQUET, 1910, CHAKRAVARTY, 1940).

Die neue Spezies unterscheidet sich von den bisher beschriebenen Arten durch unterschiedliche Wirte, geographische Verbreitung, Lokalisationen im Wirt, Sporengestalt, Schalenstreifung, Anzahl der Windungen des Polarfilaments und Sporendimensionen.

M. chelonarum hat eine vergleichbare Sporengröße (12,5- 16 µm) wie das *Myxidium* aus den *Rhinoclemmys areolata*. Die Wirte des Gallenblasenparasiten *Myxidium chelonarum* sind jedoch ausschließlich nordamerikanische Schildkröten. Im Gegensatz zu *Myxidium rhinoclemmysi* sp. nov. hat die Schalenklappe 4-6 (schräge) Streifen, das Polarfilament zeigt 5-7 Windungen und die Gestalt ist boot- oder bananenförmig.

M. americanum ist ein Nierenparasit der nordamerikanischen Weichschildkröte *Trionyx spinifera*. Es hat eine andere Gestalt (spindelförmig) und eine andere Sporengröße (15-16 µm) als *Myxidium rhinoclemmysi* sp. nov..

Ein weiterer Nierenparasit ist *M. danilewskyi*. Diese Spezies kommt bei der Europäischen Sumpfschildkröte, *Emys orbicularis*, vor und hat annähernd die gleiche Größe (10-12 µm), unterscheidet sich aber in Gestalt (verlängert spindelförmig) und geographischer Verbreitung (Frankreich) vom *Myxidium rhinoclemmysi* sp. nov..

M. mackiei ist ebenfalls ein Parasit der Nierentubuli von Schildkröten. Im Gegensatz zu *Myxidium rhinoclemmysi* haben die Sporen von *M. mackiei* spindelförmige Gestalt und sind größer (12-17 µm). Die Zahl der Streifen wurde weder in der Erstbeschreibung noch in der folgenden Beschreibung angegeben. Das Verbreitungsgebiet liegt in Indien.

In der nativen Untersuchung aller Spezies wurden nur sehr kleine vegetative Stadien gefunden. Dies liegt wahrscheinlich an der Art der Probengewinnung mittels einer großlumigen Kanüle.

Die hier beschriebenen Spezies sind alle coelozoisch, da sie in den Lumina von Hohlorganen anzutreffen sind. Allerdings scheinen die Begriffe coelozoisch und histozoisch heute aufgrund traditioneller Ursachen Verwendung zu finden, da eine deutliche Abgrenzung beider Begriffe

(siehe Glossar) kaum mehr vorgenommen wird. SHULMAN (1990) ordnete beispielsweise Plasmodien in Blutgefäßen definitiv den Gewebeparasiten (histozoischen Parasiten) zu, während nach LOM (1990) coelozoische Spezies ausnahmsweise auch in Blutgefäßen zu finden sind. Nach meiner Auffassung ist davon auszugehen, dass aufgrund der Wanderungen im Wirt (siehe Reproduktionszyklus) Plasmodien von ein und der selben Myxosporea- Spezies sowohl in Hohlorganen, als auch in Geweben anzutreffen sein können.

4.3. Methoden

Anhand der oben gezeigten Zahlen fällt auf, dass mithilfe der histologischen Untersuchungen eine größere Anzahl positiver Fälle festgestellt werden kann, als allein mittels nativer Untersuchungen.

Da beim Vergleich der Standardfärbung HE mit der Färbung MG sowohl bei den Leber- als auch bei den Nierenschnitten mit MG je etwa 20% der untersuchten Tiere als sporenpositiv erkannt wurden, die mit HE nicht erkannt worden wären, ist davon auszugehen, dass die Beobachtungen der verschiedenen Färbungen zu deutlich unterschiedlichen Ergebnissen führen. Aufgrund der seriellen Schnitttechnik gehe ich davon aus, dass die Methode, die mehr positive Ergebnisse zur Folge hat, auch der Wahrheit entspricht. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass falschpositive bzw. falschnegative Ergebnisse in die Untersuchung Eingang gefunden haben. Der Vergleich der Färbungen ZN und MG ist sehr beschränkt aussagefähig, da eine Vorauswahl getroffen wurde. Beim Vergleich der Häufigkeiten, in denen mit den verschiedenen Färbungen sporenpositive Ergebnisse erzielt wurden, stellt man fest, dass die Ergebnisse der Färbung ZN zwischen denen von HE und MG liegen.

Aufgrund der seriellen Schnitttechnik wird davon ausgegangen, dass es der Wahrheit entspricht, wenn in einer der möglichen Methoden Sporen gefunden wurden. Wurde mit einer anderen Methode nichts gefunden, liefert diese also vermutlich ein falsches Ergebnis. Dabei ist zu beachten, dass für die unterschiedlichen Färbemethoden zwar unterschiedliche Schnitte benutzt wurden, da diese aber auf dem Parafinblock direkt hintereinander lagen, wäre es sehr unwahrscheinlich, wenn in Schnitt A Sporen sind, in Schnitt B aber nicht (die Schnitte haben eine Dicke von 5 µm, während die Myxosporea- Sporen etwa 10-15 µm lang und etwa 5 µm breit sind). Es können natürlich falschpositive bzw. falschnegative Ergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Falschpositive Befunde können aufgrund von Verwechslungen zustande kommen, während falschnegative Befunde Folge einer sehr geringgradigen Infektion, des

schlechten Zustandes des Untersuchungsmaterials oder infolge suboptimaler Probenbearbeitung sein können.

Aus den Tabellen 9 und 10 geht hervor, dass MG die am besten geeignete Methode für den Sporennachweis sowohl in Leber als auch Niere ist.

4.4. Pathologie

Aufgrund des langen Transportes bei Raumtemperatur und den daraus resultierenden autolytischen Veränderungen am Untersuchungsmaterial sowie zusätzlich aufgrund des Tieffrierens ist eine Aussage zur Pathologie nur sehr bedingt möglich. Hinzu kommt die Tatsache, dass die aus der Natur entnommenen Schildkröten eine Vielzahl von bakteriellen und/ oder parasitären Infektionen aufweisen. Aufgrund der Probenbeschaffung kann nicht ausgeschlossen werden, dass vornehmlich geschwächte Schildkröten zur Untersuchung gelangten.

Es scheint nicht so zu sein, dass der Wirt durch das Vorhandensein des Parasiten vollkommen unbeeinflusst bleibt, wie dem überwiegenden Teil der Literatur zu entnehmen ist. Es konnten milde Entzündungszeichen (Pseudoeosinophilie und Melanomakrophagen- Ansammlungen) in Nieren, Leber und Gallenblasenwand infizierter Tiere festgestellt werden. Die Myxidium- Plasmodien sind aber nur dann als ursächlich für die Entzündungsreaktion anzusehen, wenn sich die Entzündungszellen in direkter Assoziation mit diesen befanden, da die genannten Entzündungszeichen auch in Organen anzutreffen waren, die ausschließlich von Trematoden befallen waren.

Nach LOM und DYKOVÀ (1995) ist die proliferative Entzündung der Hauptverteidigungsmechanismus gegen Myxosporea- Infektionen bei Fischen.

MONTALI (1988) schildert, dass Reptilien gegenüber einem weiterem Spektrum infektiöser Agenzien mit Granulomen reagieren, als Säuger dies tun. Die Zellen, die den neutrophilen Granulozyten der Säuger funktionell entsprechen, werden bei Reptilien als heterophile Granulozyten bezeichnet. Sie unterscheiden sich von diesen unter anderem durch intensive eosinophile Anfärbung („Pseudoeosinophile Granulozyten“) und durch einen monomorphen oder zweilappigen Kern. Schildkröten verfügen über zwei Arten von heterophilen Zellen:

- 1) Zellen mit einem basophilen, peripher gelegenen Kern und spindelförmigen, eosinophilen, cytoplasmatischen Granula und
- 2) Zellen vergleichbarer Größe mit einem peripheren, einzelmem oder zweigelapptem Kern und eosinophilen, sphärischen cytoplasmatischen Granula.

In histologischen Schnitten verlieren die Granula oft ihre Definition und erscheinen als abgerundet. Heterophile Granulozyten sind der vorrangige Zelltyp, der bei experimentell induzierten Entzündungen auftritt und scheinen eine wichtige Rolle in der Unterdrückung mikrobieller Invasion darzustellen.

Durch die Verstopfung der Nierentubuli mit Entwicklungsstadien der Myxosporea könnte eine Tubulonephrose mit Kongrementablagerung hervorgerufen werden, wie bei den Schildkröten Nr. 17 und 69 vermutet wird.

HELKE und POYNTON (2005) beobachteten, dass durch die Entwicklungsstadien von *Myxidium mackiei* 5-10 % der proximalen gewundenen Nierentubuli verstopft waren und die Mikrovilli komprimiert und abgeschoren wirkten. Entzündungsanzeichen konnten von den Autorinnen nicht beobachtet werden. NICHOLS (1999) beschreibt jedoch, dass bei infizierten Terekay- Schienenschildkröten die Nieren Veränderungen von einer milden Entzündung bis hin zu einer chronischen interstitiellen Nephritis aufwiesen, wobei die Tubuli erweitert waren und Zelltrümmer enthielten.

Die beobachteten Gallenblasendilatationen scheinen nicht im Zusammenhang mit einer Myxosporea- Infektion zu stehen, da die betroffenen Tiere eine Myxidium- Infektion der Nieren aufwiesen.

Vorstellbar wäre eine negative Beeinflussung von Stoffwechsel- und Resorptionsleistungen durch die reine Präsenz der Parasiten in den Organen.

Eine Einschränkung der Nieren- bzw. Leberfunktion aufgrund des Absterbens der Hepatozyten bzw. Tubulusepithelzellen wegen des intrazellulären Parasitismus erscheint ebenfalls möglich. Bei massiven Infektionen könnte auf diesem Wege eine weitgehend reaktionslose Lebernekrose, ähnlich wie bei der Toxoplasmose der Katze, resultieren (Vgl. DAHME, WEISS, 1999).

Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Myxosporea- Infektion nicht begünstigend auf die Entstehung weiterer Infektionskrankheiten (z.B. mit Trematoden) wirken kann. Dadurch könnte die allgemeine Abwehrlage der Schildkröten herabgesetzt werden.

4.5. Betroffene Organe

Es scheint keinen deutlichen Unterschied in der Befallshäufigkeit von Leber und Niere zu geben. Auch die Körperflüssigkeiten Galle und Urin weisen keine unterschiedlichen Befallshäufigkeiten auf.

Hier wurde mehrfach nachgewiesen, dass die untersuchten *Myxidium* sp. verschiedene Organe befallen (siehe Tab. 5). Dies stimmt mit dem Befund überein, der von JOHNSON (1969 b) vorliegt. Er fand Sporen von *Myxidium chelonarum* im Urin von Schildkröten, die den Parasiten in der Gallenblase beherbergten.

4.6. weitere Befunde

Die Herkunft der Bakterien, die in fast jeder Schildkröte zu finden waren, ist sehr schwer zurückzuverfolgen. Ich vermute jedoch, dass die Bakterienvermehrung in der Mehrzahl der Fälle aufgrund der ungünstigen Transportbedingungen des Untersuchungsmaterials post mortem erfolgte. Bei Schildkröte Nr. 4 wurde ein etwa pflaumengroßes Granulom am Darm sowie multiple Herde in der Leber festgestellt. In der histologischen Untersuchung konnten als Ursache für die Granulombildung säurefeste Stäbchen festgestellt werden.

44 der untersuchten Tiere (52,4%) wiesen eine Trematodeninfektion auf. Die Trematodenspezies konnte nicht bestimmt werden, da fast ausschließlich Eier und/oder Larven gefunden wurden.

Ein Zusammenhang zwischen Myxosporea- Infektion und Trematodeninfektion ist aufgrund der oben dargestellten Zahlen (Tab. 15) als wahrscheinlich einzustufen.

Das könnte daran liegen, dass eine bereits bestehende Trematodeninfektion durch eine Herabsetzung der Immunabwehr die Entstehung von Myxosporea- Infektionen bei Schildkröten begünstigt. Auch der umgekehrte Fall, also eine Begünstigung von Trematodeninfektionen durch eine vorherige Myxosporea- Infektion, wäre denkbar. Eine dritte Möglichkeit um diesen Zusammenhang zu erklären, könnte darin liegen, dass diese Trematoden als zweite Wirte im Lebenszyklus der *Myxidium*- Spezies fungieren könnten.

Als weitere Parasiten wurden Hämogregarinen (Nr. 18), Kratzer- Larven (Nr. 71) und Kokzidien (Nr. 34, 61) nachgewiesen.

4.7. Verteilung nach Gattung, Geschlecht, Alter

a) Gattung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass *Graptemys* sp. in der vorliegenden Untersuchung als sehr empfänglich für Myxosporea- Infektionen einzustufen sind, während *Phrynops* sp. eher unempfindlich zu sein scheinen, wie aus den oben gemachten Aussagen hervorgeht. Bei *Chrysemys* und *Sternotherus* stimmen der Anteil dieser Gattungen am Untersuchungsmaterial und der Anteil dieser Gattungen an infizierten Tiere weitgehend überein, wobei nicht ausgeschlossen werden kann, dass diese Befunde zufällig durch die Art der Probenbeschaffung zustande kommen. Die Unterschiede der Gattungen *Chrysemys*, *Graptemys*, *Phrynops* und *Sternotherus* sind signifikant.

JOHNSON (1969) listet 14 Schildkrötenspezies auf (siehe S. 39), in denen er *Myxidium cheilonarum* nachweisen konnte. In sieben weiteren Schildkrötenspezies fand er keine. Dabei handelte es sich um *Clemmys guttata* (Tropfen- Schildkröte), *Graptemys flavimaculata* (Gelbflecken- Höckerschildkröte), *Graptemys nigrinoda* (Schwarzkopf- Höckerschildkröte), *Kinosternon subrubrum subrubrum* (Pennsylvania- Klapp- Schildkröte), *Sternotherus minor peltifer* (nördliche Zwerg- Moschusschildkröte), *Terrapene carolina carolina* (Carolina- Dossenschildkröte) und um *Trionyx spinifer asper* (Dornrand- Weichschildkröte). Leider fehlen Aussagen darüber, wie viele Schildkröten insgesamt und wie viele Individuen einer Spezies untersucht wurden.

b) Geschlecht

Durch die vorliegende Untersuchung scheint sich abzuzeichnen, dass Schildkröten männlichen Geschlechts für eine Myxosporea- Infektion empfänglicher zu sein scheinen als weibliche Tiere, allerdings sind die Unterschiede nicht signifikant. Um diese Frage zu beantworten wären erneute Untersuchungen mit repräsentativen Stichproben aus der Grundgesamtheit erforderlich. Es sind in der Literatur leider keine Angaben zur Geschlechtsdisposition von Myxosporea- Infektionen bei Schildkröten vorhanden. In der mir bekannten Literatur über Myxosporea bei Fischen wird ebenfalls keine Geschlechtsdisposition erwähnt.

c) Alter

In der vorliegenden Untersuchung wiesen ausschließlich adulte Tiere eine Myxosporea- Infektion auf. Nach NICHOLS, 1999 sowie unveröffentlichten Ergebnissen von MUTSCHMANN können jedoch auch juvenile Schildkröten eine Myxosporea- Infektion er-

leiden. In der Literatur sind zur Alterdisposition bei Schildkröten keine weiteren Informationen vorhanden.

Bei verschiedenen Fischerkrankungen, die durch Myxosporea verursacht werden, sind die Jungtiere empfänglicher als Adulte. Dies gilt beispielsweise für die Drehkrankheit der Salmoniden (*Myxobolus cerebralis*), die Infektion mit *Sphaerospora tincae* der Schleien oder die Infektion der Welse mit *Henneguya exilis* (MITCHELL, 1977).

4.8. Schlussfolgerungen

Myxosporea- Infektionen scheinen häufiger bei Schildkröten vorzukommen, als bisher angenommen wurde.

Sie befallen unterschiedliche Organsysteme. Bisher wurde noch nicht darüber berichtet, dass Myxidium- Entwicklungsstadien auch in Darmserosa, Harnblasenwand und Gonaden von Schildkröten anzutreffen sind.

Unter den drei nachgewiesenen Myxidium- Spezies befand sich eine bislang noch nicht beschriebene Spezies, *Myxidium rhinoclemmysi* sp. nov., die dargestellt wurde (MUTSCHMANN und NEUBERT, unveröffentlicht). Die Beschreibung von *Myxidium chelonarum* und *Myxidium americanum* wurde hinsichtlich Sporengröße, Polfadenwindungen und Streifung modifiziert.

Myxosporea- Infektionen der Schildkröte scheinen entgegen den überwiegenden bisherigen Beschreibungen in der Literatur nicht gänzlich reaktionslos zu verlaufen. Wie hier dargelegt wurde, ist mit milden Entzündungsreaktionen auf die Entwicklungsstadien bis hin zu Hepatitiden oder Nephritiden zu rechnen. Durch die Verstopfung der Nierentubuli könnte möglicherweise eine Kongrementablagerung begünstigt werden. Auch Stoffwechsel- und Resorptionsstörungen aufgrund der Präsenz der Parasiten und daraus folgend Einschränkung der Nieren- bzw. Leberfunktion sind vorstellbar. Des weiteren ist nicht auszuschließen, dass eine Myxosporea- Infektion als begünstigender Faktor auf die Entstehung weiterer Infektionskrankheiten (z.B. mit Trematoden) wirken kann.

Bei Myxosporea- Verdacht der Schildkröten sollte zusätzlich zur Standardfärbung eine MG-Färbung durchgeführt werden, da diese die besten Ergebnisse der hier verglichenen Untersuchungsmethoden zu erbringen scheint.