

### 3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1. *Material und Methode*

##### 3.1.1 Tiermaterial und Haltung

Die in dieser Studie erhobenen Daten stützen sich auf sonographische Untersuchungen an insgesamt 50 adulten Schlangen der Art *Python regius* (Königspython). Diese Untersuchungen erfolgten im Rahmen einer vom Importeur gestellten Anfrage, die Tiere vor dem Verkauf auf ihren Gesundheitszustand hin zu überprüfen. Hierbei wurde der Ultraschall zusätzlich zur Allgemeinuntersuchung zur Darstellung der inneren Organe und eventueller Veränderungen, z. B. Leberabszesse, eingesetzt. Blutentnahmen wurden aus wirtschaftlichen Gründen auf 10 zufällig ausgewählte Tiere beschränkt, obwohl eine generelle Blutuntersuchung wünschenswert gewesen wäre. Eine zusätzliche histologische Untersuchung erfolgte an einem der Tiere, welches aufgrund eines wahrscheinlich beim Transport entstandenen Rippentraumas euthanasiert werden mußte.

*Systema naturae:*

<b>Familie</b>	<b>Unterfamilie</b>	<b>Gattung</b>	<b>Art</b>
----------------	---------------------	----------------	------------

Boidae → Pythoninae → Python → *Python regius* (Linné, 1735)

Das Geschlechterverhältnis von männlichen zu weiblichen Tieren, welches durch Sondierung der Hemipenistaschen ermittelt wurde, betrug 31:18. Bei einem der Tiere gelang es nicht, das Geschlecht eindeutig zu bestimmen. Bei den untersuchten Schlangen handelte es sich fast ausschließlich um Wildfänge aus Ghana, welche durch einen Reptilien-Großhändler nach Deutschland importiert worden waren. Zwei der Tiere entstammten einem Zuchtbestand in Brandenburg und waren in der 3. Generation nachgezüchtet.

Die Schlangen hatten ein Körpergewicht von 460-1685 g und maßen eine Körperlänge zwischen 80 und 130 cm. Ihr Alter betrug schätzungsweise 2-5 Jahre. Damit sind die Tiere physisch als ausgewachsen bzw. fast ausgewachsen zu bezeichnen.

Die Unterbringung erfolgte in Glas-Terrarien bei einer Temperatur von 25-35°C in Gruppen zu etwa 5 bis 10 Tieren. Gefüttert wurden die Königspythons mit Mäusen bei freier Aufnahme von Trinkwasser.

Vor der Ultraschalluntersuchung wurden alle Tiere einer gründlichen klinischen Untersuchung unterzogen (*Göbel et al. 1990*). Diese verlief in fast allen Fällen ohne besondere Befunde, sodaß nur offensichtlich gesunde Tiere zur sonographischen Untersuchung gelangten. Die einzige Ausnahme bildete das zur histologischen Untersuchung herangezogene Tier.

Die Untersuchung in Häutung befindlicher Schlangen wurde vermieden, um den Tieren in dieser Phase des erhöhten Stresses keine weitere Belastung zuzumuten, und weil es bei Manipulationen zur Abreibung der alten Haut kommen kann, bevor die neue Haut das Reifestadium der Verhornung erreicht hat (*Jacobson 1977*).

Alle Untersuchungen fanden in den Zeiträumen von Okt. 1999 – Jan. 2000 sowie Okt. 2000 – Jan. 2001 statt. Dieser Zeitraum hing von der Verfügbarkeit des Patientengutes ab, da im Frühjahr und Sommer ausschließlich neugeborene Pythons importiert werden, die für die sonographische Untersuchung zu klein sind. Bei den importierten weiblichen Schlangen kann davon ausgegangen werden, daß aus wirtschaftlichen und biologischen Gründen die Tiere weder tragend noch ovariell aktiv waren. Auch das weibliche Tier aus Brandenburger Zucht wurde zur Zeit der ovariellen Ruhephase untersucht.



**Abb. 6:** Kopfporträt eines Königspython



**Abb. 7:** Königspython

### 3.1.2 Allgemeine Untersuchung

Bei allen zu untersuchenden Tieren wurde zunächst eine allgemeine Untersuchung des Gesundheitszustandes durchgeführt (*Göbel et al. 1990*). Dabei wurde zunächst adspektorisch das Verhalten der Tiere, ihre Bewegungen mit Hinblick auf die Umgebungstemperatur, der Körperbau, die Haut, die Augen, die Nasenöffnungen und die Atmung begutachtet und in Absprache mit dem Tierpfleger eine Anamnese über Fütterung, Haltung, Kot- und Harnabsatz sowie eventuelle Verhaltensauffälligkeiten erhoben. Danach wurden das Gewicht und die Schnauzen-Kloakenlänge der Schlangen bestimmt. Anschließend wurde das Geschlecht mit Hilfe einer in den Bereich der Hemipenistaschen beim männlichen Tier eingeführten Metallsonde ermittelt (*Mader 1996*). Hierbei wurde in einigen Fällen spontan Kotabsatz ausgelöst.

Während der Geschlechtsbestimmung erfolgte die adspektorische Überprüfung der Kloakengegend. Abschließend wurde das Maul vorsichtig geöffnet und Maulschleimhaut, Zähne, Zunge und Trachealöffnung begutachtet.

Auf umfassende, weitergehende, wie z.B. parasitologische Untersuchungen wurde verzichtet. Ausnahme sind die unten aufgeführten blutchemischen und histologischen Untersuchungen.

### 3.1.3 Blutchemische Untersuchung

Bei 10 untersuchten Tieren, wurden nach der Beschreibung von Lammerschmidt (*1995*) pro Tier ca. 3 ml Blut entnommen. Dabei wurde jedoch abweichend zum Spülen der Kanülen Heparin-Calcium-Lösung statt Lithium-Heparinlösung verwandt. Das Blut wurde alsbald nach der Entnahme bei 4000 Umdrehungen/min ca. 5 Minuten zentrifugiert und die Plasmaüberstände in das biocontrol-Labor in Mainz übersandt. Die zu bestimmenden Parameter waren:

Natrium, Kalium, Calcium, Phosphat (anorg.), Magnesium, Chlorid, Alkalische Phosphatase, AST, ALT, GLDH, LDH,CK, Amylase, Lipase, Glucose, Gesamt-Protein, Harnstoff, Harnsäure, Creatinin, Cholesterin, Triglyceride und Gesamt-Bilirubin.

Zusätzlich wurde eine Serumelektrophorese zur Bestimmung von Albuminen und Globulinen durchgeführt.

Die Untersuchung des Blutes von 10 innerhalb dieser Studie geschallten Schlangen, sollte den Gesundheitszustand der Tiere und im Ultraschallbild dargestellten Organe zusätzlich beurteilen helfen.

### 3.1.4 Histologische Untersuchung

Die zur histologischen Untersuchung zu gelangenden Organe wurden zunächst während der Entnahme makroskopisch beurteilt und anschließend zur Fixierung für mindestens 24 Stunden in eine 10-prozentige Formalinlösung verbracht. Zur Herstellung von Paraffinschnitten wurden dann aus den Organen an repräsentativen oder besonders zu beachtenden Stellen etwa 3 mm breite Scheiben zugeschnitten, welche in gitterartig fenestrierte Kassetten eingespannt wurden. Darauf schloß sich der Prozess der Einbettung an. Dieser begann mit dem Entwässern und Härten der Proben. Dabei wurden die Organstücke erst in ein weiteres 10-prozentiges Formalinbad verbracht, um auch die frischen Schnittstellen genügend zu fixieren. Danach wurden sie in einer aufsteigenden Alkoholreihe (zunächst 70%, dann 80%, zweimal 96% und abschließend dreimal 99%) mit vergälltem Alkohol zur Vorbereitung auf die Durchtränkung mit dem hydrophoben Paraffin vollständig entwässert. Weiterhin wurden die Kassetten in einem letzten Zwischenschritt vor dem Paraffinbad dreimal in Xylol als Übergangsmedium getaucht. Anschließend folgte das Bad in etwa 60°C warmem Paraffin.

An diesen Arbeitsschritt schloß sich das Gießen der zu bearbeitenden Paraffinblöcke, das sog. „Aufblocken“ an. Hierbei wurde eine Gießform mit flüssigem Paraffin gefüllt und die durchtränkten Organteile auf den Boden der Form verbracht. Dabei lag die zu schneidende Ebene horizontal, d.h. parallel zum Boden der Gießform, obenauf wurden die Gießformen mit einem Gitter gedeckelt, welches, fest im Paraffin eingeschlossen, später zum Einspannen in das Mikrotom genutzt wurde. Zum schnellen Abkühlen der Blöcke wurden die Formen dann auf eine etwa minus 5°C kalte Platte gestellt. Nach dem Erkalten wurden die Paraffinblöcke aus der Gießform entnommen und zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Der Schneidevorgang begann mit dem Einspannen der einzelnen Blöcke in ein Serienschnittmikrotom. Nach der Parallelitätseinstellung des Gerätes, d.h. dem Einstellen einer optimalen Schneidenführung am Paraffinblock und dem Trimmen, also dem Schneiden des Blockes bis zum Erreichen der zu untersuchenden Gewebeschicht, wurden ca. 2 µm dünne Schnitte angefertigt und in erst kaltem, dann warmem Wasser geglättet und anschließend auf Objektträger aufgezo-

Zum anschließenden Färben wurden die über Nacht bei ca. 40°C getrockneten Präparate in Paraclear-Lösung entparaffiniert und dann einer Hämalaun-Eosin-Färbung unterzogen.

Hierbei wurde zunächst nach einer absteigenden Alkoholreihe (zweimal 99%, dann 96%, 80% und 70%) und einem Bad in destilliertem Wasser eine Kernfärbung mit dem hydrophilen Hämalaun durchgeführt. Nach dem sog. „Bläuen“ in Leitungswasser, einer pH-Wert abhängigen Reaktion zur Farbtintensivierung, und dem „Differenzieren“, dem Entfärben der Zellkörper mit 2 prozentiger Essigsäure, folgte erneut eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 80%, 96%). Danach erfolgte die Gegenfärbung mit dem hydrophoben Eosin und anschließender Entfernung des Eosinüberschusses in 96 prozentigem und zweimal 99 prozentigem Alkohol.

Abschließend gelangten die Präparate in ein Xylolbad, wurden dann mit einer klebstoffähnlichen klaren Substanz, dem Entellan, und einem Deckgläschen bedeckt und gelangten anschließend nach Aushärtung des Entellans zur mikroskopischen Untersuchung. Die weitere Dokumentation der Schnitte erfolgte durch Fotografieren und Einscannen der Diapositive in den Computer.

Auch die Ergebnisse dieser Untersuchung sollten den Gesundheitszustand des im Ultraschallbild dargestellten Organes dokumentieren.

### 3.1.5 Ultraschalluntersuchung

Die Untersuchungen erfolgten in den überwiegenden Fällen mit dem Ultraschallgerät „Scanner 100 S VET“ der Fa. Pie Medical, wobei ein Annular-Array-7,5 Mhz-Mehrfachwinkel-Schallkopf verwendet wurde. Hierbei wurde ausschließlich das B-Mode-Verfahren genutzt. Bei den 2 Tieren, die einer zusätzlichen Echokardiographie mit Dopplerverfahren unterzogen wurden, kam das Gerät „Kontron sigma iris 440“ der Fa. Kontron mit ebenfalls einem Annular-Array-7,5 Mhz-Schallkopf zum Einsatz.

Die Bildwiederholffrequenz (frame rate) betrug 11, bei Herzuntersuchungen 22 frames/s.

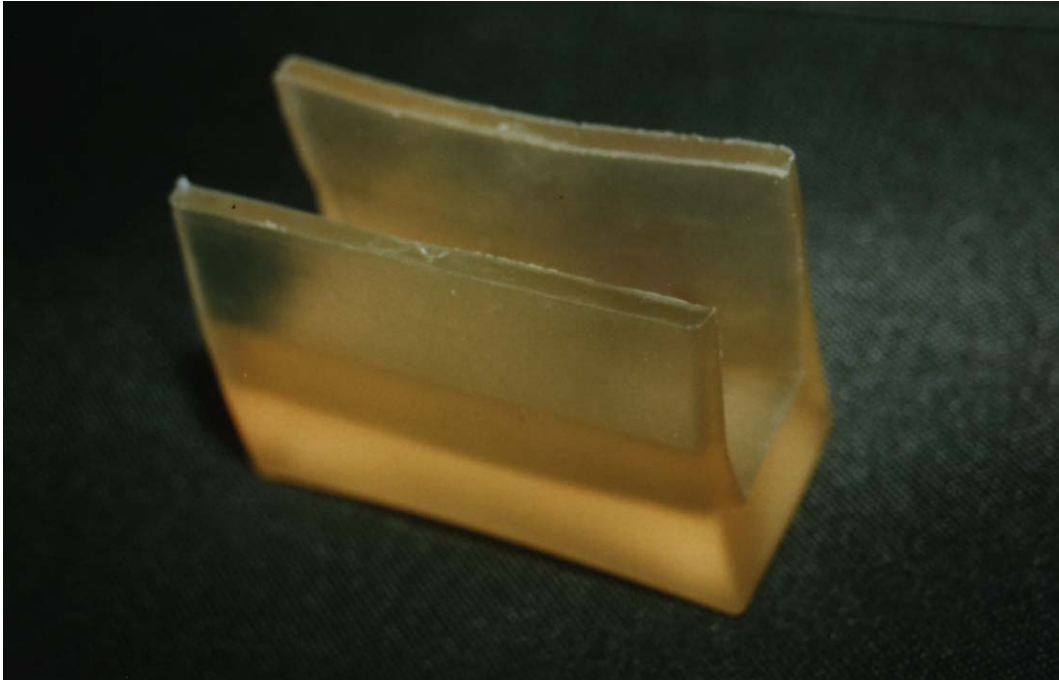
In der Einarbeitungsphase wurden zum Zwecke der Erlernung der Technik und Optimierung der Ergebnisse ca. 25 Schlangen sonographisch untersucht, ohne daß deren Ergebnisse in die Studie einfließen.

Anschließend gelangten für diese Studie 50 adulte Königspythons zur Ultraschalluntersuchung, deren Dauer ca. 1 Stunde pro Tier betrug.

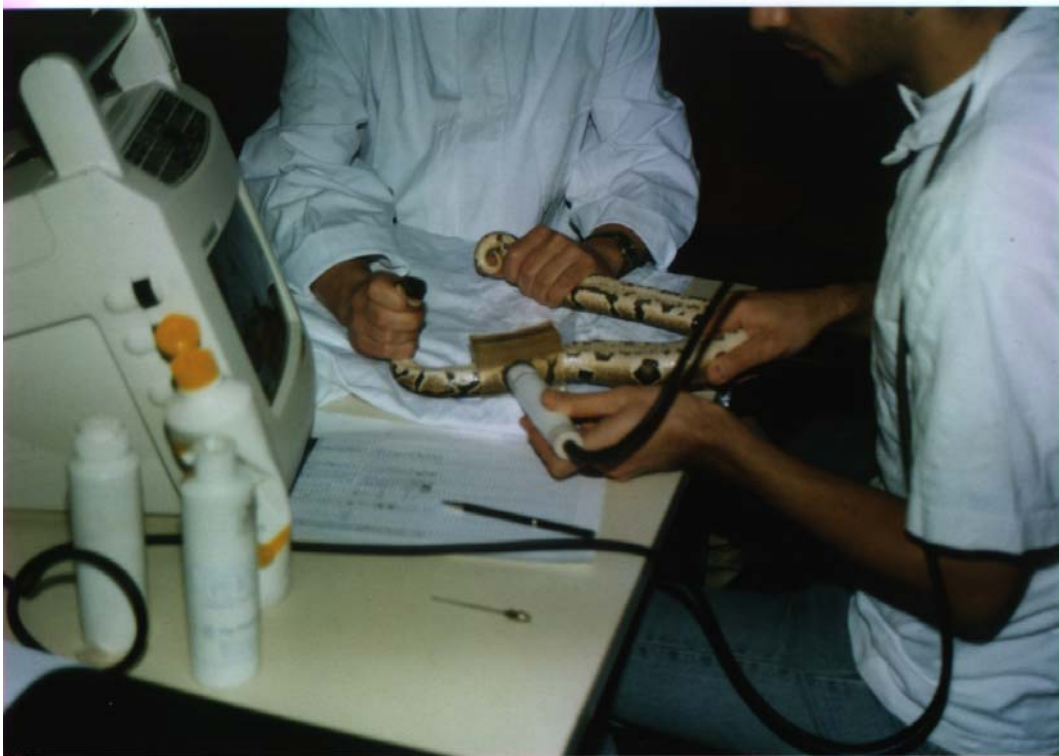
Die bereits erwähnten 10 Schlangen, bei denen zusätzlich Blut entnommen wurde, wurden in einem Doppelblind-Ansatz je zweimal im Abstand von ca. einer Stunde untersucht.

Die Fixation der Schlangen erfolgte manuell durch eine Hilfsperson ohne Verwendung einer Sedation oder Narkose. Dabei wurden die Schlangen hinter dem Kopf und etwa in der Mitte des Körpers sowie im Kloakenbereich fixiert und in Rückenlage verbracht.

Anschließend an die allgemeine Untersuchung wurde als Erstes adspektorisch die ungefähre Lage des Herzens bestimmt (Pulsation der Bauchwand). Dann wurde ein Ultraschallgel der Marke Aquasonic® 100 der Fa. Parker Laboratories, Inc. aufgetragen, auf dem unter leichtem Druck und Seitwärtsbewegungen eine umgedrehte Vorlaufstrecke für Linearschallköpfe plaziert wurde. Auf diese wurde ebenfalls Ultraschallgel aufgebracht und der Schallkopf angesetzt. Danach erfolgte die sonographische Durchmusterung in Sagittal-, Vertikal- und Dorsalebene.



**Abb. 8:** Vorlaufstrecke für Linearschallköpfe



**Abb. 9:** Untersuchung des Herzens in Dorsalebene

Die Untersuchung der weiteren Organe erfolgte in ihrer Reihenfolge von kranial nach kaudal in gleicher Art und Weise, wobei zum Auffinden der Organe die etwaige anatomische Lage



angepeilt wurde und zwischenzeitlich auf eine Vorlaufstrecke verzichtet wurde. Diese kam bei der anschließenden, eingehenden Organ-Untersuchung regelmäßig zum Einsatz.

Das Abmessen der Organgrenzen erfolgte durch vorübergehende Markierung während der Ultraschalluntersuchung mittels Filzstift auf der Haut der Tiere und anschließendem Messen mit einem flexiblen Metermaß. Gemessen wurde in halben Zentimeter-Schritten.

Bei denen im Doppel-Blind-Ansatz untersuchten Tieren wurde die Untersuchung der einzelnen Tiere nach einer etwa halbstündigen Pause unter möglichst gleichen Voraussetzungen wiederholt, um die Genauigkeit der Methode und des Untersuchers zu überprüfen.

Das an einem Rippen trauma leidende Tier wurde nach der Ultraschalluntersuchung euthanasiert. Bei der anschließenden Sektion wurde unter visueller Kontrolle der teilweise freigelegten Organe eine weitere sonographische Untersuchung zur Überprüfung der identifizierten Strukturen vorgenommen. Die danach für die histologische Untersuchung entnommenen Organe wurden zusätzlich in einem Wasserbad geschallt.

Sektionen gesunder Tiere wurden absichtlich vermieden.

### 3.1.6 Dokumentation

Die Dokumentation der Ultraschallbilder erfolgte über direkte Speicherung auf Computerdisketten, durch Videoaufzeichnung und durch Ausdruck mit Hilfe eines Thermoprinters. Der Untersuchungsgang wurde fotografisch dokumentiert. Bei der Digitalisierung von Bildmaterial kam ein hochauflösender Scanner der Marke Sharp, Modell JX-325 zum Einsatz. Dieses Material sowie die auf Disketten als bitmap-Dateien gespeicherten Bilder wurden mit Hilfe einer Software des Herstellers Adobe Systems Incorporated namens Adobe Photoshop 5.0<sup>®</sup> als tiff- oder psd-Dateien bearbeitet und letztendlich teilweise als bitmap-Dateien, teilweise als jpeg-Dateien auf CD gebrannt.

Alle weiteren Daten über die untersuchten Tiere und die Organlagen wurden handschriftlich in einem standardisierten Untersuchungsprotokoll festgehalten und später in Microsoft Excel<sup>®</sup>-Tabellen übertragen.

### 3.1.7 Statistische Methoden

#### 3.1.7.1 Beschreibende Statistik

Alle gemessenen Daten wurden im Institut für Biometrie der FU Berlin von Microsoft Excel<sup>®</sup>-Tabellen in das SPSS<sup>®</sup>-Format übertragen. Um die Verteilung der Stichproben zu beschreiben, wurden Mittelwert, Median, Minimum, Maximum, 25% Perzentil und 75% Perzentil angegeben.

Bei den Organlagen und -längen handelt es sich analog zu der Arbeit von Keil (1990) um relative Angaben bezogen auf die Schnauzen-Kloakenlänge.

Zur Überprüfung der Fehlerquelle durch die Untersuchungsmethode wurden die Differenzen der in einer Doppelblindstudie an 10 Schlangen gemessenen Wertepaare (1. Wert – 2. Wert) von Organgrenzpunkten gebildet und überprüft, wie nahe sie im Mittel dem Idealergebnis „0“ kamen. Zudem wurde der maximale Fehler überprüft.

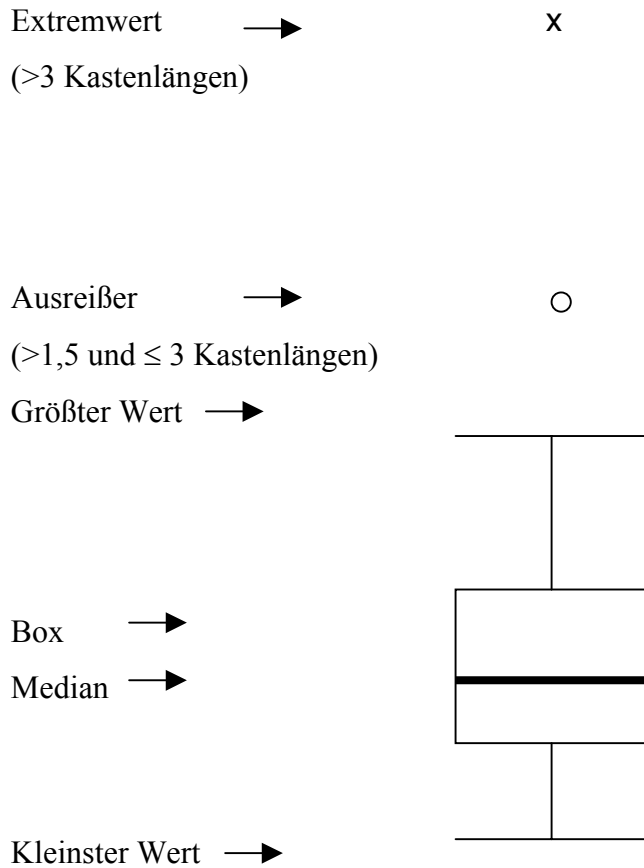
#### 3.1.7.2 Graphische Darstellung

Zur graphischen Darstellung der Stichprobendaten wurden Boxplot-Diagramme mit Hilfe des Softwareprogramms „SPSS<sup>®</sup> für Windows 10.0“ erstellt.

Bei diesen wird die Box vom ersten und dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt, ihre innere Linie repräsentiert den Median. Kleinster und größter Wert, sofern sie nicht als Ausreißer oder Extremwerte (s.u.) zu bezeichnen sind, werden mit den Linien außerhalb der Box dargestellt.

Werte, die um mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen (Extremwerte) werden im Boxplot mit einem Stern markiert. Werte, die um weniger als drei aber mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis gekennzeichnet (*Bühl und Zöfel 2000*).

Beispiel zur Verdeutlichung:



**Gr. 01**

### 3.1.7.3 Analytische Statistik

Alle verwendeten statistischen Tests und Rechenmethoden wurden mit Hilfe des Programmes „SPSS® für Windows10.0“ durchgeführt und sind von Bühl und Zöfel (2000) im Buch „SPSS® Version 10“ beschrieben.

Aufgrund der verschiedenen Größen der Schlangen wurde mit relativen Werten gerechnet. Die gemachten Angaben beruhen daher alle auf Auswertungen mit nichtparametrischen Methoden, da nicht von einer Normalverteilung der gewonnenen Daten ausgegangen werden konnte.

Zur Erkennung eventueller, geschlechtlicher Unterschiede bei den gemessenen und errechneten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Mit dem Mann-Whitney-U-Test wird überprüft, ob Daten aus zwei unabhängigen Zufallsstichproben die gleiche Lage besitzen. Hierbei werden alle Daten aus beiden Gruppen gemischt, und jeder Wert vom höchsten bis zum niedrigsten einem Rang zugeordnet. Sind die Grundgesamtheiten in der Lage identisch, sollten sich die Ränge zufällig zwischen den beiden Stichproben mischen. Mit dem U-Test läßt sich die Nullhypothese testen, daß sich der durchschnittliche Rang der Individuen beider Stichproben nicht unterscheidet (*Bortz et al. 1990; Bühl und Zöfel 2000*).

Da es sich hierbei um eine explorative Statistik zur Suche nach Gemeinsamkeiten und Unterschieden ausschließlich bezüglich der in dieser Studie erhobenen Daten handelt, können nicht automatisch verallgemeinernde Schlußfolgerungen gezogen werden.