

3. Eigene Untersuchungen

3. 1. Material und Methoden

3.1.1. Material und Materialbeschaffung

Untersucht wurden 84 Schildkröten, die im Labor der Firma Exomed im Zeitraum Mai 2004 bis Juli 2004 eingesandt wurden. Dabei handelte sich zum weit überwiegenden Teil um die Transportverluste eines Großimporteurs, ansonsten um Einzeltiere aus privaten Haltungen.

Es wurden Schildkröten folgender Spezies/ Gattungen mit der in Tab. 2 genannten prozentualen Verteilung untersucht (84 gültige Fälle):

Tabelle 2 Häufigkeiten der Schildkrötengattungen

Gattungen		Häufigkeit	Gültige Prozente
Gültig	Graptemys sp.	28	33.3
	Chrysemys sp.	14	16.7
	Phrynops sp.	14	16.7
	Sternotherus sp.	13	15.5
	Rhinoclemmys areolata	4	4.8
	Kinosternon sp.	3	3.6
	Trionyx (Apalone) ferox	3	3.6
	Trachemys sp.	2	2.4
	Chinemys reevesii	1	1.2
	Emys orbicularis	1	1.2
	Platemys platycephala	1	1.2
	Gesamt	84	100.0

3.1.2. Lagerung und Transport von Untersuchungsmaterial

Die Tiere wurden tot und zum Großteil tiefgekühlt eingesandt bzw. in Einzelfällen kurz nach der Euthanasie frisch untersucht. Der Todeszeitpunkt konnte daher in den überwiegenden Fällen nicht bestimmt werden. Da es sich mehrheitlich um die Transportverluste eines Importeurs handelte, ist davon auszugehen, dass die Schildkröten über längere Zeit bei Raumtemperatur gelagert wurden. Vor Sektionsbeginn erfolgte ein schonendes Auftauen über etwa 2 Tage im Kühlschrank bei +4°C. Etwa 10 Tiere wurden gekühlt angeliefert und bis zum Sektionsbeginn ebenfalls bei +4°C im Kühlschrank gelagert.

3.1.3.Übersicht der untersuchten Tiere und Organe

Das Alter der untersuchten Tiere verteilt sich wie aus Tab. 3 und Abb. 11 zu entnehmen ist (84 gültige Fälle):

Tabelle 3 Häufigkeiten Alter

Alter	Anzahl (n)	Gültige Prozente
Gültig juvenil	15	17.9
adult	69	82.1
Gesamt	84	100.0

Das Geschlecht der juvenilen Tiere (< 1 Jahr) konnte aufgrund autolytischer Prozesse und/oder infolge des Tiefkühlens in Zusammenhang mit der kleinen Körpergröße nicht bestimmt werden und wurde deshalb mit unbekannt angegeben.

Die Geschlechtsbestimmung erfolgte aufgrund makroskopischer Unterschiede der Gonaden, in Zweifelsfällen histologisch. Die Geschlechtsverteilung der untersuchten adulten Schildkröten ist Tabelle 14 und Abb. 12 zu entnehmen.

Tabelle 4 Häufigkeiten Geschlecht

Geschlecht	Anzahl (n)	Gültige Prozente
Gültig weiblich	24	28.6
männlich	45	53.6
unbekannt	15	17.9
Gesamt	84	100.0

3.1.4. Untersuchungsgang: Sektion, native Untersuchung, Abklatschpräparate

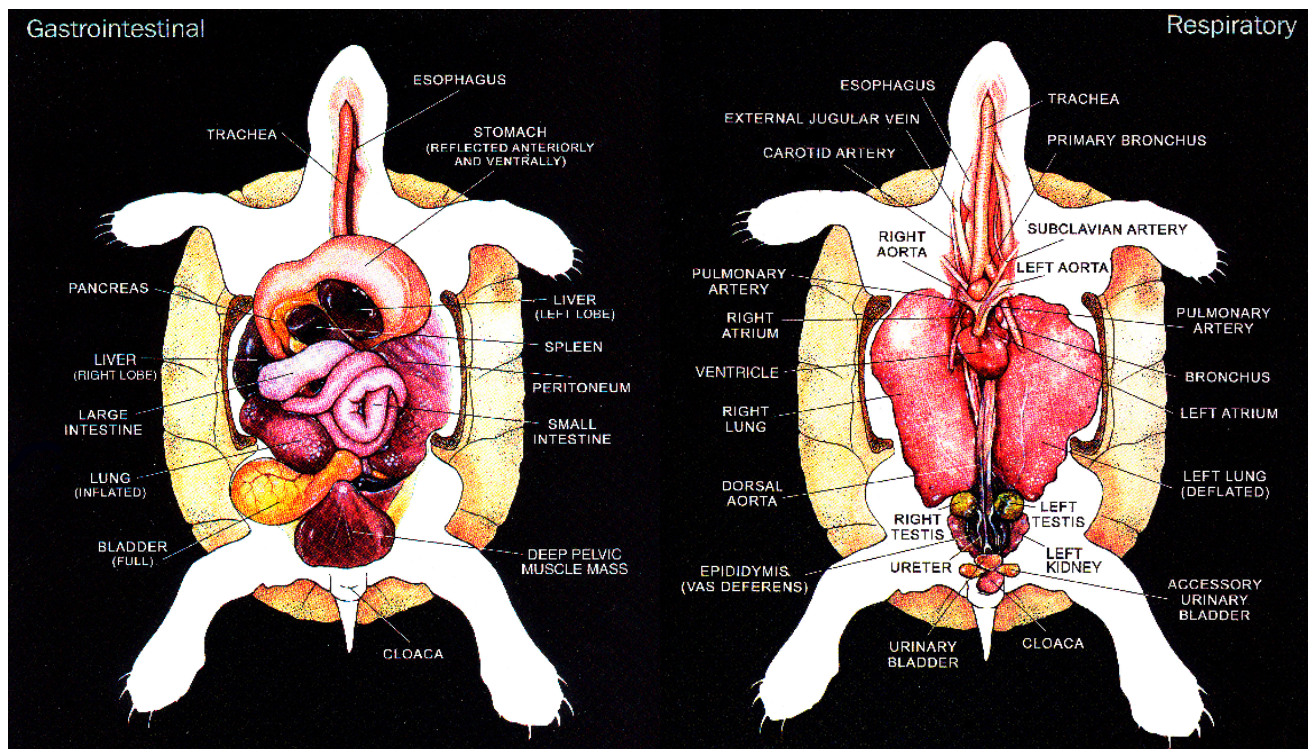
Vor Untersuchungsbeginn erfolgte die Speziesbestimmung, fotografische Dokumentation, Vermessung der Carapaxlänge und die Ermittlung des Gewichts der zu untersuchenden Tiere. Dann wurde mithilfe eines Trennschleifers das Plastron jeweils zwischen den gleichseitigen Vorder- und Hinterextremitäten eröffnet. Nach Abtrennung der Muskulatur vom Plastron und Eröffnung des Peritoneums wurde das Plastron entfernt. Es schloss sich nach makroskopischer Beurteilung des Organsitus (siehe Abb. 13) die routinemäßige Entnahme von Leber, Gallenblase, Darm, Nieren, Harnblase und Gonaden und zusätzlich die Entnahme verändert erscheinender Organe für die histologische Untersuchung an.

Die Gewinnung von Galle und Urin für die native Untersuchung geschah mittels einer Spritze mit aufgesetzter großlumiger Kanüle. Diese Körperflüssigkeiten wurden auf Objektträger verbracht und sofort mikroskopiert.

Außerdem erfolgte die Herstellung von Abklatschpräparaten der Leber und Nieren, um sie ebenfalls sofort nativ zu untersuchen.

Zusätzlich fand die Anfertigung Giemsa- gefärbter Präparate von Leber, Galle, Niere und Urin für die Mikroskopie statt.

Abbildung 10 Anatomie von *Pseudemys scripta scripta*, aus WITHERINGTON & WYNEKEN, 2003



3.1.5. Histologie und Färbemethoden

Die Fixierung der Organproben für die histologische Untersuchung erfolgte über mindestens 24 Stunden in 4%igem gepuffertem Formalin.

Die formalinfixierten Organe wurden in einem Automatenystem in aufsteigender Alkoholreihe entwässert und in Parafin eingebettet. Es schloss sich die routinemäßige Anfertigung von 3-7 µm dicken Schnitten auf einem Schlittenmikrotom an.

Folgende Färbungen kamen zum Einsatz:

1. Hämatoxylin- Eosin (HE)
2. Ziehl- Neelsen (ZN)
3. May Grünwald- Giemsa (MG)

Färbeprotokolle finden sich im Anhang.

3.1.6. Elektronenmikroskopie

Für die Elektronenmikroskopie wurden ausgewählte Organproben in 3%igem cacodylatgepuffertem Glutaraldehyd (4°C, pH 7,2) fixiert. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung (REM) fand dankenswerter Weise durch Herrn Dr. Bleiss (Institut für molekulare Parasitologie der Humboldt Universität zu Berlin) statt.

3.1.7. Mikroskop, Aufnahmeverfahren, Messung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte unter Verwendung des Mikroskops Axioskop2plus der Firma Zeiss. Digitale Aufnahmen wurden mithilfe der Zeiss AxioCam MRC angefertigt, und die Bildverarbeitung und Messung der Sporendaten wurde mit dem Programm Axio Vision 3.1 von Zeiss durchgeführt. Zur Vermessung der Myxosporea- Sporen fanden native Ausstriche ohne Konservierung oder Färbung Verwendung. Je nach Befallsintensität erfolgte die Vermessung von mindestens fünf Sporen pro Probe, in den überwiegenden Fällen bilden jedoch 10- 15 Messdaten pro Probe die Grundlage der Sporendimensionen.

3.1.8. Auswertung, Statistik, Software

Folgende Programme wurden benutzt: Word 2000, Excel 2000, SPSS 12.0