

Eine einfache Methode zur Blutentnahme bei *Zootoca vivipara* (JACQUIN, 1787)

SYLVIA HOFMANN

Abstract

A simple method of blood collection from Zootoca vivipara (JACQUIN, 1787).

With a new technique blood can be collected from the artery or vein in the elbow ventral site.

Besides, a 1-2 mm long cut is led with a sterile scalpel blade and the escaping drop of blood is taken with a glass capillary tube. Subsequently the wound is disinfected and heals within fewer days. After collection, the blood is immediately transferred to sterile blood tubes containing TL-Buffer (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit II, PEQLAB GmbH) and stored at -70°C .

This is a save and simple alternative method compared to collect blood from caudal vessels (risk of tail loss) or cardiac puncture (not praticable in the field).

Within the scope of a research project on *Zootoca vivipara* 486 single blood samples from 149 adult, 160 subadult and 177 juvenile lizards were collected by using this technique. In none of the cases complications occurred.

Key words: Lacertidae: *Zootoca vivipara*; blood samples; preservation; DNA; field technique.

Zusammenfassung

Eine Alternative zu der Blutentnahme aus der ventralen Caudalvene, bei welcher das Risiko der Schwanzautotomie sehr hoch ist, oder der Herzpunktur, die im Freiland nicht anwendbar ist, stellt die Gewinnung von Blut aus arteriellen oder venösen Gefäßen in der Ellbeuge dar.

Dabei wird mit einer sterilen Skalpellklinge ein 1-2 mm langer Schnitt geführt, der austretende Blutropfen mit einer Glaskapillare aufgenommen und die Entnahmestelle anschließend desinfiziert. Eine vollständige Wundheilung erfolgt in der Regel binnen weniger Tage. Die Blutprobe (5-20 μl) wurde in TL-Puffer (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit II, PEQLAB GmbH) überführt und bis zur Aufarbeitung (DNA-Präparation) bei -70°C tiefgefroren.

Im Rahmen eines Forschungsprojektes an *Zootoca vivipara* wurden 149 adulte, 160 subadulte und 177 juvenile Tiere einmalig mit dieser Methode beprobt. In keinem der Fälle kam es zu Komplikationen.

Schlagwörter: Lacertidae: *Zootoca vivipara*; Blutproben; Konservierung; DNA; Geländemethode.

1 Einleitung

Bei kleineren Reptilien sind die Möglichkeiten einer schadfreien Entnahme von Gewebeproben sehr beschränkt. Gegenüber der Probennahme durch Abschneiden von Teilen des Schwanzes oder Zehenamputation – Methoden, die zunehmend auf Widerstand im Rahmen des Tierschutzgesetzes stoßen und in Tierversuchsanträgen oft nicht mehr genehmigt werden – sind Techniken zur Blutabnahme meist weniger beeinträchtigend für das Tier. Blut ist, gegenüber Gewebe, für unterschiedlichste Analysen nutzbar (z. B. Allozym-, Protein-, DNA- oder immunologische Untersuchungen) und stellt aufgrund der hohen Zellanteile bereits in geringen Mengen qualitativ hochwertiges Probenmaterial dar.

Im Rahmen eines Forschungsprojektes an *Zootoca vivipara* wurde die am gefangenen Tier einmalige Entnahme von Blut für populationsgenetische Untersuchungen notwendig. Ziel war es, eine Methode zu etablieren, die eine Alternative bietet zu der Entnahme von Blut aus der ventralen Caudalvene (Vena coccygealis ventralis) oder Caudalarterie (Arteria coccygealis ventralis) (ESRA 1975, POWELL & KNESEL 1992, JOGER et al. 1986, JOGER & LENK 1997), bei welcher das Risiko einer Autotomie des gesamten

oder von Teilen des Schwanzes sehr hoch ist. Da Waldeidechsen und hier in besonderem Maße weibliche Tiere sehr leicht Schwanzteile oder den gesamten Schwanz autotomieren, wurde von einem Ansatz in diesem Bereich abgesehen. Die Caudalregion fungiert bei Eidechsen nachweislich als Energiereservoir, erhöht die Mobilität und mutmaßlich den Reproduktionserfolg geschlechtsreifer Tiere (FOX & MCCOY 2000, CLOBERT et al. 2000), so dass sich ein Verlust des Schwanzes für das Individuum nachteilig auswirken kann.

In den Jahren 2000-2002 wurden bis dato in der Elster-Luppe-Aue bei Schkeuditz (Sachsen) sowie an ausgewählten Standorten in Sachsen-Anhalt 486 Waldeidechsen als Neufänge beprobt, davon 149 Adulti, 160 Subadulti und 177 juvenile Tiere. Die Blutproben werden für populationsgenetische Untersuchungen mittels Mikrosatelliten-Analyse herangezogen.

2 Die Blutentnahme

Für die Blutabnahme werden handelsübliche Skalpellklingen (Gr. 15-18), heparinierte Einmal-Kapillarpipetten (20-50 μ l), 0,5-1,5 ml Kunststoff-Tubes, TL-Puffer (E.Z.N.A.® Tissue DNA Kit II, PEQLAB GmbH) oder TRIS-HCl (10 mM, pH = 8,0), Desinfektionsmittel (CUTASEPT®), Wundspray (Aluminium-Spray ATAROST®) sowie ein wasserfester Marker benötigt.

Die Blutentnahme erfolgt an der Innenseite des Ellbogen (Ellbeuge) der linken oder rechten Vorderextremität, wobei das Tier in einer Hand so fixiert wird, dass eine ruhige Skalpellführung gewährleistet ist (Abb. 1). Eine Desinfektion der Entnahmestelle ist ratsam (CUTASEPT®). Mittels der sterilen Skalpellklinge wird ein 1-2 mm langer, oberflächlicher Schnitt geführt, die Haut sollte dabei lediglich „geritzt“ werden, so dass Muskulatur oder größere Blutgefäße (A. brachialis, A. radialis, Abb. 4)



Abb. 1. Fixierung der Eidechse in der linken Hand zur Blutabnahme.

Handling of a lizard for blood sampling.

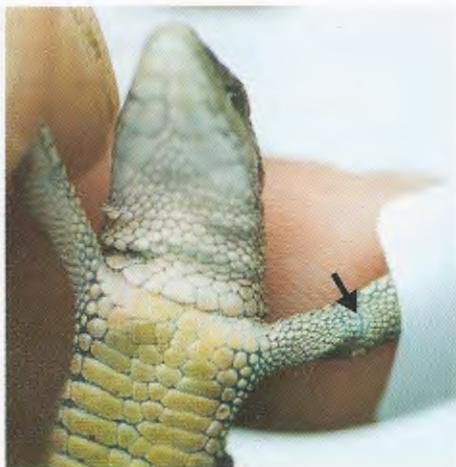


Abb. 2. Verheilte Blutentnahmestelle bei einem wiedergefangenen Weibchen.

Recaptured female with an old scar by blood sampling.



Abb. 3. Verheilte Blutentnahmestelle bei einem wiedergefangenen Männchen.
Recaptured male with an old scar by blood sampling.

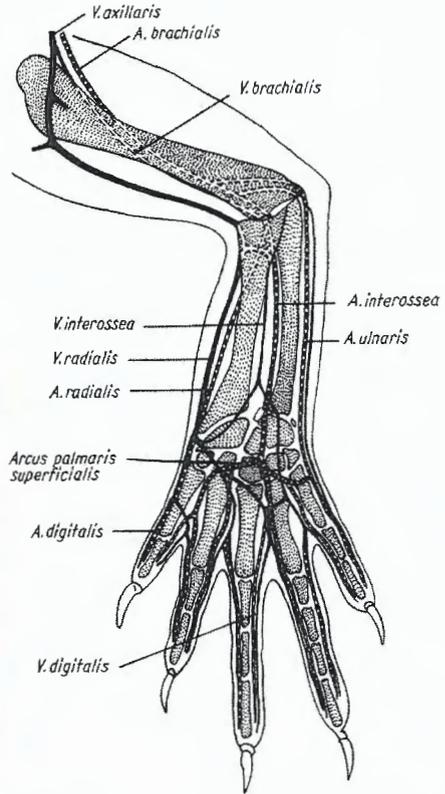


Abb. 4. Arterien und Venen der Vorderextremität (*Lacerta agilis*). Nach KÄMPFE et al. (1980).
Arteries and veins of the foreleg (*Lacerta agilis*). After KÄMPFE et al. (1980).

nicht verletzt werden. Der austretende Tropfen Blut wird mittels Glas-Kapillare aufgenommen und in Plastiktubes mit 100-200 µl TL-Puffer überführt. Ein Nachbluten der Entnahmestelle ist nur selten der Fall, da eine sehr rasche Gerinnung einsetzt. Die Entnahmestelle wird anschließend mit Aluminium-Spray behandelt, was für einen nachhaltigen Wundverschluss sorgt, die Abheilung beschleunigt und desinfizierend wirkt. Bei geübter Handhabung ist diese Methode weit weniger zeitaufwändig als die Blutabnahme mit Injektionsspritzen und Kanülen und kann bereits bei subadulten Tieren angewendet werden. Juvenile Tiere sollten ein Mindestalter von etwa acht Wochen und damit eine Kopf-Rumpf-Länge von mindestens 35-40 mm (Gewicht > 1 g) haben, um ihnen eine Blutmenge von 5 µl entnehmen zu können.

Beprobte Tiere wurden nach der Blutentnahme an Ort und Stelle wieder entlassen und konnten meist schon wenige Minuten später beim Sonnenbad beobachtet werden. Wiederfänge wiesen bereits nach zwei Tagen eine vollständig geschlossene Entnahmestelle auf, welche nach einigen Tagen nur noch anhand einer kleinen Narbe (Abb. 3 u. 4) erkennbar war.

3 Die Lagerung der Proben

Sämtliche im Freiland gewonnenen Proben wurden nach der Blutentnahme sofort in einer Styroporbox vorübergehend auf Eis (Kühlakkus) gelagert und anschließend bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung (DNA-Präparation) tiefgefroren. Der Einsatz von TL-Puffer als Konservierungsmittel hat sich in dieser Untersuchung bewährt, da er bei der DNA-Präparation für die Mikrosatelliten-Analyse als Ausgangsmedium verwendet wird und ein Umpipettieren der Proben im Labor entfallen kann. Er sollte aber bei Analysen, in denen das Platzen von Zell- und Organellmembranen vermieden werden soll, durch geeignete Medien wie TRIS-HCl oder andere, spezifische Puffer ersetzt werden.

4 Schlussbemerkung

Vorteile der vorgestellten Methode sind die geringe Beeinträchtigung der Tiere infolge der Beprobung, die Herabsetzung des Risikos der Autotomie, der geringe Zeitaufwand und der komplikationsfreie Ablauf. Zudem können Wiederfänge auch nach Jahren als solche erkannt werden (Abb. 2 u. 3) und unterliegen nicht der Gefahr, ein zweites Mal beprobt zu werden.

Nachteile dieser Methode sind die begrenzte zu gewinnende Blutmenge von 5-20 μl , gegenüber dem mit Injektionskanülen aus der Caudalvene potentiell zu entnehmenden Blutvolumen von 50 μl sowie die einmalige Beprobung der Tiere an der entsprechenden Entnahmestelle. Zur Vermeidung von Infektionen sind Einmalskalpelle zu benutzen, beziehungsweise die Klinge vor und nach jeder Probengewinnung zu sterilisieren. Schlüpflinge können mit dieser Methode nicht beprobt werden, wobei es prinzipiell nicht möglich erscheint, Blut von lebenden, frisch geschlüpften Waldeidechsen zu entnehmen.

Schriften

- CLOBERT, J., A. OPLIGER, G. SORCI, B. ERNANDE, J.G. SWALLOW & T. GARLAND Jr (2000): Trade-offs in phenotypic traits: endurance at birth, growth, survival, predation and susceptibility to parasitism in a lizard, *Lacerta vivipara*. – *Functional Ecology*, **14**: 675-684.
- ESRA, G.N., K. BENIRSCHKE & L.A. GRINER (1975): Blood collection technique in lizards. – *J. Amer. Vet. Med. Assoc.*, **167**: 555-556.
- FOX, S.F. & J.K. MCCOY (2000): The effect of tail loss on survival, growth, reproduction, and sex ratio of offspring in the lizard *Uta stansburiana* in the field. – *Oecologia*, **122**: 327-334.
- JOGER, U., E. WALLIKIEWITZ & A. HAUSCHILD (1986): Hormon- und serochemische Untersuchungen zur Bestimmung des Geschlechts und zur Überprüfung des Gesundheitszustands bei *Trachydosaurus rugosus* (GRAY, 1827) (Sauria: Scincidae). – *Salamandra*, **22**(1): 21-28.
- & P. LENK (1997): Entnahme und Behandlung von Blutproben für molekulargenetische Untersuchungen in der Feldherpetologie. – S. 329-340 in: HENLE, K. & M. VEITH (Hrsg.): Naturschutzrelevante Methoden der Feldherpetologie. – *Mertensiella*, **7**.
- KÄMPFE, L., R. KITTEL & J. KLAPPERSTÜCK (1980): Leitfaden der Anatomie der Wirbeltiere. – Jena (Gustav Fischer).
- POWELL, S.C. & J.A. KNESEL (1992): Blood collection from *Macroclermys temmincki* (TROOST). – *Herp. Rev.*, **23**(1): 19.

Eingangsdatum: 3. Juli 2002

Verfasser: SYLVIA HOFMANN, Zoologisches Institut der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, AG Spezielle Zoologie/Herpetologie und Biodiversität, Domplatz 4, D-06108 Halle/S., Deutschland; E-mail: s.hofmann@zoologie.uni-halle.de.