

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 MATERIAL UND METHODEN

3.1.1 PATIENTENMATERIAL

Um Zusammenhänge zwischen ausgewählten Entzündungsparametern im Pferdeblut zu untersuchen, wurden retrospektiv Blutuntersuchungen ausgewertet. Die Blutproben stammten von Pferden, die von Januar 1997 bis September 1999 in der Medizinischen und Gerichtlichen Veterinärklinik I (MVK I), Professur für Innere Krankheiten des Pferdes, der Justus-Liebig-Universität Gießen zur stationären Behandlung vorgestellt wurden. Für die vorliegenden Untersuchungen wurde je Patient eine Probe untersucht. Ausgewertet wurden bei allen Pferden folgende Parameter: Gesamtleukozytenzahl, Differentialzellbild, Blutsenkungsreaktion, Hämatokrit, Fibrinogen, Gesamteiweiß, Albumin und Globuline.

Zusätzlich wurde bei einem Teil dieser Patienten (von denen Serum verfügbar war) eine Serumproteinelektrophorese (SPE) durchgeführt.

3.1.2 EINTEILUNG DER PATIENTEN IN GRUPPEN

Das vorhandene Patientenmaterial wurde in drei Gruppen eingeteilt.

Ausgeschlossen wurden Patienten, bei denen nicht alle benötigten Parameter der labordiagnostischen Blutuntersuchungen vorlagen. Ausgeschlossen wurden weiter Patienten, bei denen keine eindeutige Diagnose gestellt werden konnte, bzw. deren Erkrankung eine Einteilung in eine der drei vorgegebenen Gruppen nicht zuließ.

Die Einteilung in die drei Gruppen erfolgte nach folgenden Kriterien:

Bei **Gruppe 1** handelt es sich um die Kontrollgruppe. Die Tiere zeigten zum Zeitpunkt der Blutentnahme ein ungestörtes Allgemeinbefinden, keine erhöhte Körperinnentemperatur und die klinische Untersuchung ergab keinerlei Hinweis auf eine entzündliche Erkrankung. In dieser Gruppe befinden sich vor allem Pferde, die in o.g. Klinik ein bis drei Tage vor der Blutentnahme wegen Koliksymptomatik vorgestellt wurden.

Die Patienten der **Gruppe 2** zeigten eine mittel- bis höchstgradige Störung des Allgemeinbefindens, die mit und ohne Fieber einherging. Die klinische Untersuchung der Tiere ergab Anzeichen für das Vorliegen einer entzündlichen Erkrankung. Die Dauer der Erkrankung bei Vorstellung lag zwischen einem Tag und vier Wochen.

In **Gruppe 3** befinden sich die Pferde, bei denen klinisch eine COB (chronisch obstruktive Bronchitis) diagnostiziert wurde.

500 Pferde konnten einer dieser Gruppen zugeteilt werden. 300 Tiere befinden sich in Gruppe 1, in Gruppe 2 wurden 107 Pferde eingeordnet, auf die Gruppe 3 entfielen 93 Pferde. Innerhalb der Gruppen 1 und 2 wurden zusätzlich Sensitivität und Spezifität für folgende Parameter berechnet: Gesamtleukozyten, Fibrinogen, Gesamteiweiß und Albumin (siehe Kap. 3.2.4; S. 81 ff.). Die Verteilung der 500 Patienten in unterschiedliche Rassen, Alter und Geschlecht der Tiere ist der Tabelle 4 zu entnehmen.

Tab. 4: Rasse, Alter und Geschlecht der Patienten

Rasse	gesamt (n)	Wallach (n)	Stute (n)	Hengst (n)	Alter² ($\bar{x} \pm s$)	SPE³ (n)
Warmblut	360	175	161	24	$9,7 \pm 5,4$	251
Kleinpferde ¹	96	47	44	5	$9,3 \pm 5,8$	62
Vollblut	22	5	13	4	$9,4 \pm 5,2$	14
Araber	11	2	8	1	$7,6 \pm 5,5$	7
Kaltblut	11	4	3	4	$5,3 \pm 3,6$	7
gesamt	500	233	229	38	$9,5 \pm 5,5$	341

¹ = Gruppe umfasst: Isländer, Haflinger, Reitponys, Norweger, Shetlandponies

² = In Jahren

³ = durchgeführte Serumproteinelektrophoresen

3.1.3 LABORDIAGNOSTISCHE BLUTUNTERSUCHUNGEN

3.1.3.1 Blutentnahme und Bearbeitung der Proben

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Vena jugularis externa bzw. Entnahme über einen in der Vene liegenden Verweilkatheter. Hierbei wurden heparinisierte Kunststoffröhrchen, Glasröhrchen ohne gerinnungshemmenden Zusatz und Glasröhrchen mit Zusatz von Natriumzitrat direkt befüllt. Die Blutuntersuchungen mit Ausnahme der Elektrophorese wurden von routiniertem Personal im Labor der MVK I durchgeführt. Die Elektrophoresen wurden von der Autorin selbst durchgeführt.

Zellzahlmessung, Anfertigung eines Blutausstriches, Bestimmung der Blutsenkungsreaktion und Plasmagewinnung erfolgten innerhalb von 2 Stunden nach Blutentnahme. Messungen aus dem Plasma erfolgten innerhalb von 4 Stunden. Serumproben wurden innerhalb von 6 Stunden durch Zentrifugation bei 1400 g für 20 Minuten gewonnen, in Eppendorfgefäße abgefüllt und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -18 °C gelagert.

3.1.3.2 Routinebestimmungen

Im Rahmen der Routinebestimmungen erfolgte die Messung folgender Parameter: Leukozytengesamtzahl, Differentialzellbild, Blutsenkungsreaktion, Hämatokrit, Gesamteiweiß, Albumin, Globuline und Fibrinogen.

Die Blutsenkungsreaktion wurde mit der Standzylindermethode durchgeführt. In einem 10 ml Glasröhrchen (Durchmesser 1cm) wurden 2 ml Natriumzitrat (3,8 %ig) vorgelegt. Anschließend wurde das Röhrchen während der Venenpunktion direkt mit 8 ml Vollblut aufgefüllt und durch vorsichtiges vertikales Schwenken vermischt. Senkungswerte in Millimetern wurden nach 30 Minuten unmittelbar an der Skala des Röhrchens abgelesen. Diese Skala ist so kalibriert, dass 0,1 ml Volumen einer Senkungsstrecke von 1 mm entspricht.

Die Hämatokritmessung wurde mit Hilfe einer Mikrohämatokritzentrifuge (Hettich, Tuttlingen) durchgeführt.

Die Bestimmung der Leukozytengesamtzahl erfolgte durch den Microcellcounter F 800 (Sysmex, Hamburg). Das Differentialzellbild der Leukozyten wurde manuell durch Auszählen von 100 Zellen im Pappenheim-gefärbten Ausstrich erstellt.

Die Fibrinogenkonzentration des Blutes wurde mit dem Testsystem Multifibren® (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg) ermittelt. Dieses Testsystem bestimmt den Gehalt an Fibrinogen mit der Methode nach Clauss.

Mit Hilfe des Cobas Mira plus (Roche Diagnostika, Grenzach) wurden Gesamteiweiß- (GE) und Albumingehalt im Blutplasma bestimmt (GE mittels Biuret, Albumin durch Bromcresolgrün). Die Konzentration an Globulinen im Plasma wurde durch Subtraktion der Albumin- von der GE-konzentration berechnet.

3.1.3.3 Serumproteinelektrophorese (SPE)

Eine Elektrophorese wurde bei 341 der 500 Patienten, von denen Serum verfügbar war, von der Autorin durchgeführt. Hierbei wurden 202 Pferde der Gruppe 1, 76 Pferde der Gruppe 2 und 63 Pferde der Gruppe 3 untersucht.

Die für die Elektrophorese verwendeten Serumproben wurden bis zur Analyse bei -18°C gelagert. Die Lagerungsdauer betrug 4 Wochen bis 1,5 Jahre. Für die Bestimmung wurden die Proben bei Zimmertemperatur aufgetaut, durch vorsichtiges Schwenken gründlich gemischt und anschließend für 30 Sekunden bei 1500 g zentrifugiert. Für die SPE wurde der Überstand verwendet.

Die Elektrophorese erfolgte durch das Elektrophoresesystem Paragon® (Beckman Instruments, USA). Verwendet wurde das hochauflösende Agarosegel SPE-II (1% Agarose, 1,2% Tris Barbital-Aspartat-Puffer) des Herstellers. 50 µl jeder Serumprobe wurden im Verhältnis 1:4 mit 200 µl des mitgelieferten B 2-Barbitalpuffers (pH 8,6; 0,075 M) vermischt. Die Laufzeit betrug 25 Minuten bei einer Stromstärke von 100 Volt und einem pH-Wert von 8,6. Die Gele wurden nach Angabe des Herstellers fixiert, getrocknet und mit Paragon®-Blau (0,5% Aminonaphtol-Schwefelsäure) gefärbt.

Die Auswertung der Gele wurde mittels Appraise®-Densitometer (Beckman Instruments, USA) bei einer Wellenlänge von 600 nm durchgeführt. Die Einteilung der Einzelfractionen erfolgt bei dem Gerät nach der „Drop-line“-Methode (siehe 2.3.2). Die Begrenzungen sind beliebig zu setzen, das Gerät berechnet die entsprechende Fläche in dem abgegrenzten Bereich in Prozent der Gesamtfläche, wobei diese dem Gehalt an

Gesamteiweiß im Serum entspricht. Es wurde in 6 Fraktionen unterteilt: Albumin, α_1 -, α_2 -, β_1 -, β_2 - und γ -Globuline, wobei die „Schulter“ an der kathodalen Seite des Albumin zu den α_1 -Globulinen gezählt wurde. Grundlage für die Berechnung der absoluten Werte der Einzelfraktionen waren die unmittelbar nach Probenentnahme ermittelten Werte des Gehaltes an Gesamteiweiß. Da diese Werte im Plasma gemessen wurden, wurden von ihnen jeweils die ermittelte Menge an Fibrinogen, welches im Serum nicht enthalten ist, subtrahiert.

Um eine möglichst objektive Bewertung der Elektropherogramme zu erreichen, wurden sämtliche Auswertungen von der Autorin innerhalb von zwei Tagen durchgeführt.

Zudem erfolgten die Auswertungen anonym, d.h. Besitzer- und Pferdenamen waren zum Zeitpunkt der Auswertung durch einen Zahlencode ersetzt, ebenso war der Autorin nicht bekannt, welcher der drei Gruppen der Patient zugeordnet worden war.

3.1.3.4. Lagerungsversuch von Seren

Für die Ermittlung absoluter Konzentrationen der Eiweißfraktionen aus den prozentualen Werten des Elektropherogramms wird die Konzentration an Gesamteiweiß im Serum benötigt. Da die Serumproteinelektrophoresen (SPE) nach unterschiedlicher Lagerungsdauer der Serumproben bei -18°C durchgeführt wurden, schien es notwendig zu überprüfen, ob die Bestimmung v.a. des Gesamteiweiß- aber auch des Albumingehaltes von der Lagerung beeinflusst wird.

Hierfür wurden von 8 klinisch unauffälligen Pferden (6 Warmblüter, 2 Kaltblüter; 4 Stuten, 2 Wallache, 2 Hengste; 3,5 bis 18 Jahre) nach oben genannter Methode Serumproben gewonnen. In diesen Proben wurden Gesamteiweiß- und Albumingehalt direkt gemessen und Serumproteinelektrophoresen durchgeführt. Das Serum wurde anschließend in mit einer Gummidichtung versehene Schraubdeckelgefäße aliquotiert, so dass für jede Folgeuntersuchung ein eigenes Probenvolumen zur Verfügung stand, und bei -18°C gelagert. Erneute Messungen erfolgten eine und vier Wochen nach Serumgewinnung sowie in der Folge zweimal im Abstand von 5 Wochen.

3.1.4 STATISTISCHE METHODIK

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON 1993) auf den Rechnern der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die graphischen Darstellungen und Tabellen wurden mit Hilfe der Programme Excel® (Version 7.0) bzw. Word® (Version 7.0) der Firma Microsoft (USA) erstellt.

Zur Datenbeschreibung wurden mittels des Programmes BMDP1D arithmetische Mittelwerte (\bar{x}), Standardabweichungen (s), Minima (x_{\min}), Maxima (x_{\max}) und Stichprobenumfänge (n) berechnet und tabellarisch wiedergegeben. Mit dem Programm BMDP2D wurden die Daten auf ihre Normalverteilung überprüft, bei rechtsschiefer Verteilung positiver quantitativer Merkmale wurde eine logarithmische Transformation der Daten durchgeführt. Hierbei wurden Nullwerte durch den halben Wert der unteren Nachweisgrenze ersetzt, da das Logarithmieren der Null nicht möglich ist. Die Datenbeschreibung wurde dann durch geometrische Mittelwerte (\bar{x}_g) und Streufaktoren (SF) vorgenommen. Die Darstellung der Streufaktoren erfolgte in der Form $\bar{x}_g \cdot SF^{\pm 1}$.

Zur statistischen Prüfung des Gruppeneinflusses auf Signifikanz wurde bei den angenähert normalverteilten Merkmalen eine dreifaktorielle Kovarianzanalyse ohne Wechselwirkungen mit dem Programm BMDP2V durchgeführt. Als Einflussfaktoren wurden die Variablen Gruppe, Geschlecht und Rasse (qualitativ) sowie das Alter (quantitative Kontrollvariable) überprüft. Bei signifikantem Resultat wurde anschließend ein paarweiser Gruppenvergleich (zwischen Gruppe 1 und 2 bzw. 1 und 3) mit demselben Verfahren durchgeführt. Bei den paarweisen Gruppenvergleichen wurde für den α -Fehler eine Adjustierung nach Bonferroni vorgenommen. In den graphischen und tabellarischen Darstellungen der Daten finden sich die rohen Mittelwerte, welches die teilweisen hohen Streuungswerte erklären kann.

Es wurden folgende Benennungen der Signifikanzen verwendet:

$p \leq 0,001$: hoch signifikant	(in Tabellen und Abbildungen: ***)
$p \leq 0,01$: signifikant	(in Tabellen und Abbildungen: **)
$p \leq 0,05$: schwach signifikant	(in Tabellen und Abbildungen: *)
$p > 0,05$: nicht signifikant (ns)	(in Tabellen und Abbildungen: ns)

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte bei den quantitativen Merkmalen mit Hilfe von Korrelationsanalysen durch das Programm BMDP6D. Die Angabe der Zusammenhänge erfolgte durch den Korrelationskoeffizienten (r). Bei der Benennung von Signifikanzen wurden o.g. Bezeichnungen verwendet.