

3 Material und Methoden

3.1 Der landwirtschaftliche Betrieb

Die Untersuchungen erfolgten in der Zeit von Februar 2000 bis März 2001 auf einer Färsenaufzuchtanlage in Brandenburg. Der Betrieb wird mit etwa 10 Tage alten Kälbern aus einem Milcherzeugerbetrieb beliefert, der zu der selben Gesellschaft gehört.

In der Färsenaufzuchtanlage werden die Kälber aufgezogen, bei Erreichen des Gewichtes von etwa 380 kg belegt und auf Trächtigkeit untersucht. Etwa im siebten Trächtigkeitsmonat werden die Tiere wieder in die Milchviehanlage gebracht.

3.2 Haltung der Studientiere

3.2.1 Haltung der Neugeborenen

Die Abkalbungen in der Milchviehanlage (etwa 2500 pro Jahr) fanden über das ganze Jahr verteilt statt. Unmittelbar nach der Geburt wurden die Kälber gewogen und in Einzelbuchten aus Laminatsperrholz mit Einstreu untergebracht. Das vom Muttertier abgemolkene Kolostrum erhielten die Neugeborenen in Portionen von zwei bis drei Litern. Die erste Kolostrumgabe erfolgte unmittelbar nach der Geburt, die zweite und dritte nach vier beziehungsweise acht Lebensstunden. Die Tränke wurde zweimal täglich über Eimer mit Gummisaugern verabreicht. Die Kälber unterlagen in der Milchviehanlage täglichen tierärztlichen Kontrollen. Alle Diagnosen und entsprechende Therapien wurden auf Gesundheitskarten dokumentiert.

Jeden Monat wurden durchschnittlich 100 weibliche Kälber aus der Milchviehanlage im Alter von etwa ein bis zwei Wochen in die Färsenaufzuchtanlage transportiert und dort zur weiteren Aufzucht eingestallt.

Die Bullenkälber der Milchviehanlage wurden an einen Viehhändler verkauft.

3.2.2 Haltung der Tränkekälber

Der Tränkekälberbereich der Färsenaufzuchtanlage bestand aus insgesamt 3 Ställen mit 18 Laufboxen, die jeweils 25 Tiere aufnehmen konnten. Die Einstallung erfolgte rotationsartig fortlaufend. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen fanden sich zwischen 300 und 360 Kälber im Alter von einer Woche bis zu drei Monaten im Tränkekälberbereich der Aufzuchtanlage. Jede Bucht hatte einen Liegebereich mit Tiefstreu und davor eine Lauffläche aus Beton (Zweiflächenbucht, Größe etwa 5m x 7m). Auf den Laufflächen befanden sich die Futterplätze und je ein computergesteuerter Tränkeautomat (AlfaLaval) für Milchaustauscher, sowie eine Selbsttränke zur Wasseraufnahme ad libitum.

Die im Alter von etwa einer Woche eingestellten Kälber wurden mit handelsüblichem Milchaustauscher bis zur 10. Lebenswoche getränkt und erhielten ab der zweiten Lebenswoche zusätzlich Heu. Kraftfutter wurde ab der dritten Woche, Maissilage ab der neunten Woche angeboten.

Für die Versorgung der Kälber waren zwei Mitarbeiter des Betriebes zuständig. Die betreuenden Tierärzte besuchten den Betrieb täglich. Alle Erkrankungen und Therapien wurden in einem Behandlungsbuch dokumentiert.

Die Enthornung der Kälber wurde in der 6. bis 8. Lebenswoche vorgenommen.

Die hygienischen und klimatischen Bedingungen waren als gut zu bezeichnen.

3.2.3 Haltung der Absatzkälber und Jungrinder

Im Alter von sechzehn bis achtzehn Wochen wurden die Kälber umgestallt. Außer den Kälberställen gab es in der Anlage drei große Produktionshallen. Hier waren die Tiere in Laufboxen unterschiedlicher Größe untergebracht. Die Gruppengröße lag zwischen 10 und 12 Tieren pro Box. Alle Boxen hatten Vollspaltenböden. Die Größe der Spalten war dem Alter und Gewicht der Tiere angepasst. Die baulichen Gegebenheiten ermöglichten kein konsequentes Rein-Raus-Verfahren, sondern die Tiere wurden rotationsartig umgestallt. Die Umstallung erfolgte, wenn neue Jungtiere nachrückten und tragende Färsen die Anlage verließen. Die Rinder wurden ganzjährig im Stall gehalten.

Gefüttert wurde eine Totale Mischration aus Maissilage, Häckselstroh, Heu, Kraftfutter und Mineralfutter. Einmal täglich erhielten die Färsen zusätzlich Schlempe aus der betriebseigenen Brennerei. Zur Wasseraufnahme ad libitum waren in jeder Box Selbsttränken angebracht.

3.2.4 Impfungen

In der Milchviehanlage wurden die Kälber am zweiten Lebenstag oral gegen Salmonellen (Zoosaloral[®], Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH) geimpft.

In der Aufzuchtanlage wurde in den ersten zwei Lebensmonaten zweimal im Abstand von 14 Tagen gegen Trichophytie (Trichovac[®], Impfstoffwerk Dessau-Tornau GmbH) immunisiert.

3.3 Versuchsgestaltung

3.3.1 Studiengruppen

3.3.1.1 Versuchsgruppe

Für die Versuchsgruppe kamen alle weiblichen Kälber in Betracht, die im Rahmen der täglich durchgeführten tierärztlichen Kontrollen aufgrund von respiratorischen Symptomen auffielen. Die Aufnahmekriterien sahen eine Rektaltemperatur von $\geq 40,0$ °C vor. Zusätzlich musste das Allgemeinbefinden und die Atemfrequenz mittel - bis hochgradig gestört sein. Zeigten die Tiere am Aufnahmetag weitere Erkrankungen, die eine Entzündung beinhalteten oder waren die Kälber vor weniger als 2 Wochen mit einem Antibiotikum oder Antiphlogistikum vorbehandelt, wurden sie vom Versuch ausgeschlossen. Traten während des Untersuchungszeitraumes andere entzündliche Erkrankungen oder hochgradige Durchfälle auf, wurden die Tiere ebenfalls vom Versuch ausgeschlossen.

3.3.1.2 Kontrollgruppe

Für die Kontrollgruppe kamen alle weiblichen Tiere in Betracht, die keinerlei Anzeichen einer respiratorischen oder entzündlichen Erkrankung zeigten. Diese Tiere durften nicht vorbehandelt sein. Wurde ein Tier während des Versuches krank, so schied es aus der Kontrollgruppe aus.

3.3.2 Klinische Untersuchungen

An folgenden Untersuchungstagen wurden die Versuchs – und Kontrolltiere begutachtet:

***Tabelle 3:** Zusammenfassung des zeitlichen Ablaufes der Untersuchungen*

Zeitlicher Ablauf der Untersuchungstage	
Untersuchungstage	Tage
1. Untersuchungstag	Tag 0 = Aufnahme
2. Untersuchungstag	Tag 1
3. Untersuchungstag	Tag 2
4. Untersuchungstag	Tag 3
5. Untersuchungstag	Tag 7

Nach Aufnahme eines Tieres in die Studie wurden die Körpermasse und die Rektaltemperatur festgestellt. Das Allgemeinbefinden des Kalbes sowie die Atemfrequenz, Atembeschwerden, gegebenenfalls Husten und eventueller Nasenausfluss wurden dokumentiert. Dann erfolgte die Entnahme von Blutproben und die Ultraschalluntersuchung.

Nicht alle Untersuchungen wurden bei Versuchs – und Kontrolltieren an allen Tagen durchgeführt. Die Tabelle 4 zeigt das Schema der durchgeführten Untersuchungen an den einzelnen Untersuchungstagen für die Studiengruppen.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Probennahmen bei den Versuchs (V) – und Kontrolltieren (K) an den Untersuchungstagen

Untersuchter Parameter	Tage der Untersuchung und Probennahme in den Studiengruppen										
	0		1		2		3		7		
	V	K	V	K	V	K	V	K	V	K	
Körpermasse	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rektaltemperatur	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Allgemeinbefinden	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Atemfrequenz	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Husten	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Nasenausfluss	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dyspnoe	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Blutentnahme auf Haptoglobin	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Blutentnahme auf Fibrinogen	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
Ultraschalluntersuchung	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+

Die klinischen Daten wurden mittels numerischer Schlüssel festgehalten. In der Tabelle 5 sind die Kodierungen für die Dokumentation zusammengestellt.

Tabelle 5: Numerischer Schlüssel für die klinischen Parameter

Codierungen der klinischen Befunde in den Studiengruppen		
Klinischer Parameter	Befund	Code
Allgemeinbefinden	ohne besonderen Befund	0
	gering - mittelgradig gestört	1
	hochgradig gestört	2
Husten	nein	0
	einzelne Hustenstöße	1
	häufige Hustenstöße	2
Nasenausfluss	ohne besonderen Befund	0
	serös	1
	eitrig	2
Dyspnoe	ohne besonderen Befund	0
	mittelgradig erhöht	1
	hochgradig erhöht	2

Nachdem am Tag der Aufnahme alle Untersuchungen abgeschlossen waren, erfolgte eine Therapie durch einen der betriebsbetreuenden Tierärzte je nach Zugehörigkeit zu einer der drei Behandlungsgruppen. An den folgenden Tagen wiederholten sich die Untersuchungen und Behandlungen nach dem Behandlungsschema.

3.3.3 Behandlungsgruppen

Die Versuchstiere wurden alternierend ihrer Aufnahme drei verschiedenen Gruppen zugeteilt. Die in den Behandlungsgruppen eingesetzten Medikamente sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tabelle 6: *Eingesetzte Medikamente und ihre Dosierungen in den Behandlungsgruppen*

Gruppe	Medikament	Dosierung
Gruppe 1	Florfenicol Nuflor [®] , 30%ig, ESSEX Tierarznei, München	20 mg/kg Körpermasse, 2 x im Abstand von 48 Stunden
Gruppe 2	Oxytetryklin Oxytetracyclin 5p [®] , Bela-pharm, Vechta	10 mg/kg Körpermasse, 3 bis 5 x alle 24 Stunden
Gruppe 3	Florfenicol Nuflor [®] , 30%ig, ESSEX Tierarznei, München	20 mg/kg Körpermasse, 2 x im Abstand von 48 Stunden
	Flunixin-Meglumin, Finadyne RP [®] , 5%ig, ESSEX Tierarznei, München	5 mg/kg Körpermasse, 1 x am Aufnahmetag

3.3.4 Beurteilung der Behandlung

Die Beurteilung der Behandlung wurde ab dem letzten Behandlungstag vorgenommen.

Ein Behandlungserfolg lag vor, wenn die Rektaltemperatur bis 14 Tage nach der letzten Behandlung des untersuchten Tieres $\leq 39,5$ °C betrug und das Allgemeinbefinden und die Atmung nicht oder höchstens geringgradig gestört waren.

Fiel das Tier später als 14 Tagen nach der letzten Behandlung erneut aufgrund pneumonischer Symptome auf, wurde von einer Neuinfektion ausgegangen. Das Kalb erfüllte vorher die Kriterien eines Behandlungserfolges und wurde dementsprechend protokolliert. Die Untersuchungen wurden nicht wieder aufgenommen.

Ein Misserfolg der Behandlung lag vor, wenn zwischen Tag 1 und 5 nach der letzten Behandlung die oben genannten Kriterien nicht erfüllt waren. Bei einem Misserfolg der Behandlung wurde das betroffene Tier mit anderen Präparaten weiterbehandelt. Der Fall wurde als Misserfolg protokolliert, die Untersuchungen nicht wieder aufgenommen.

Ein Rückfall lag dann vor, wenn die Kälber zunächst die Kriterien eines Behandlungserfolges am Tag nach der letzten Behandlung erfüllten und in dem Zeitraum von 5 bis 14 Tagen nach der letzten Behandlung die Einschlusskriterien erneut erfüllten. Die Untersuchungen wurden nicht wieder aufgenommen, der Fall jedoch als Rückfall protokolliert.

3.3.5 Transkutane Ultraschalluntersuchung der Lunge

Für die transkutane Ultraschalluntersuchung wurde das Gerät „Scanner 100 Vet“ der Firma Pie Medical Deutschland B. V., Dorsten, verwendet. Als Schallkopf wurde eine Mikrokonvexsonde mit einer Frequenz von 7,5 MHz eingesetzt.

Die Tiere wurden mit einem Halfter fixiert und im Stehen untersucht.

Der zu untersuchende Bereich wurde mittels dreier Untersuchungslinien unterteilt. Die dorsale Linie lag in Höhe des Hüfthöckers, die mittlere in Höhe des Buggelenkes und die ventrale in Höhe des Ellenbogengelenkes.

In Abbildung 7 ist die topographische Lage der linken und rechten Lunge im Brustkorb des Rindes dargestellt. Es sind jeweils die drei Untersuchungslinien und die acht Schallpunkte auf den Körperseiten eingezeichnet.

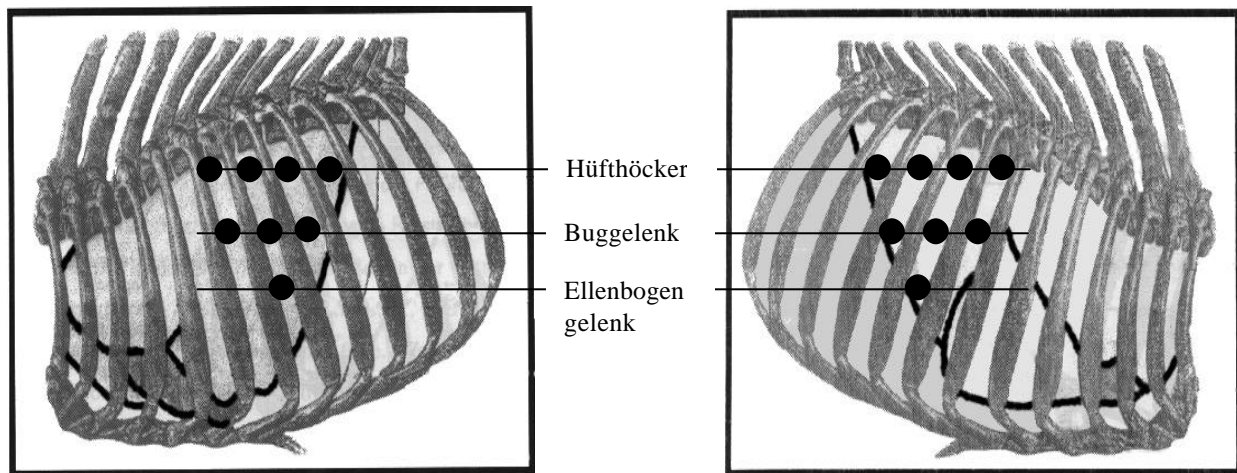


Abbildung 7: Topographie der linken und rechten Lunge des Rindes und Darstellung der gedachten Hilfslinien und Ultraschallpunkte (modifiziert nach Popesko, 1993)

Bei der Untersuchung wurde ein einheitliches Untersuchungsschema eingehalten, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Es wurde immer am caudalsten Punkt der Hilfslinie in Höhe des Hüfthöckers angefangen und in cranialer Richtung vorgearbeitet. Mit der mittleren und unteren gedachten Hilfslinie wurde in gleicher Weise verfahren. Beide Körperseiten wurden untersucht.

Zur Herstellung des Kontaktes zwischen Haut und Schallkopf wurde 70%iger Alkohol in dem Fell verteilt. Die Mikrokonvexsonde wurde mit mäßigem Druck auf die Haut aufgesetzt. Stellte sich nicht sofort ein Bild dar, wurde mehr Alkohol aufgetragen oder durch leichtes Hin- und Herrücken das Fell vor der Sonde entfernt und der Schallkopf direkt auf der Haut platziert. Nach Beendigung der Untersuchungen wurde das Tier mit einem Handtuch abgetrocknet, um den restlichen Alkohol aus dem Fell zu entfernen.

3.3.6 Sonographische Befunde an der Lunge

3.3.6.1 Gut belüftetes Lungengewebe, Wiederholungsartefakte

In den Abbildungen 8 und 9 sind die sonographischen Befunde von zwei Kälbern dargestellt, die in dem untersuchten Bereich gut belüftetes Lungengewebe aufwiesen.

Die verschiedenen Schichten der Brustwand stellen sich als Streifen unterschiedlicher Echogenität dar. Schallkopfnah erkennt man unter der Haut und Unterhaut die Interkostalmuskulatur. Daran schließt sich die Pleura als hyperechogene Linie an. Während der Atmung kann das Gleiten der pleuralen Oberfläche über die Thoraxwand beobachtet werden. Anstelle des Lungparenchym, das wegen seines Luftgehaltes nicht dargestellt werden kann, stellen sich medial der Pleura im Bereich der Lungenoberfläche Wiederholungsartefakte dar.

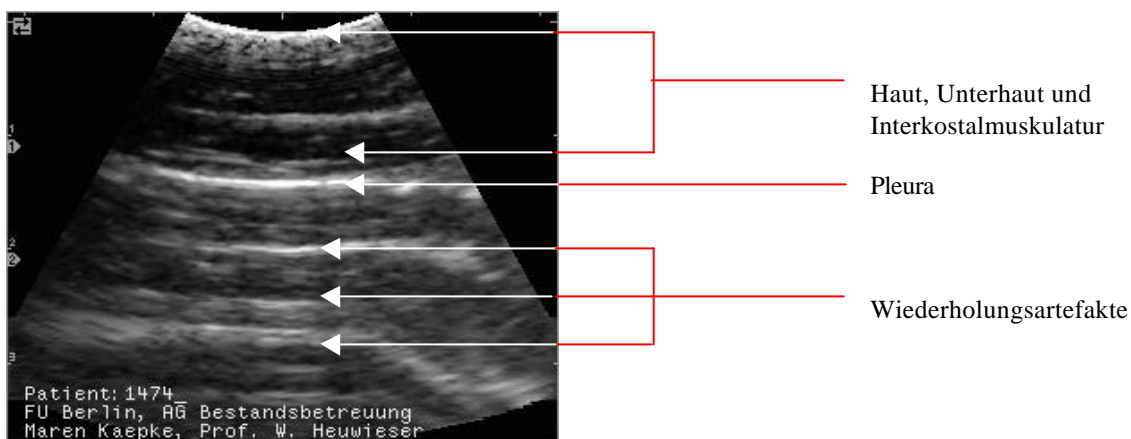


Abbildung 8: *Ultraschallbild eines gesunden Lungenbereiches (Wiederholungsartefakte)*

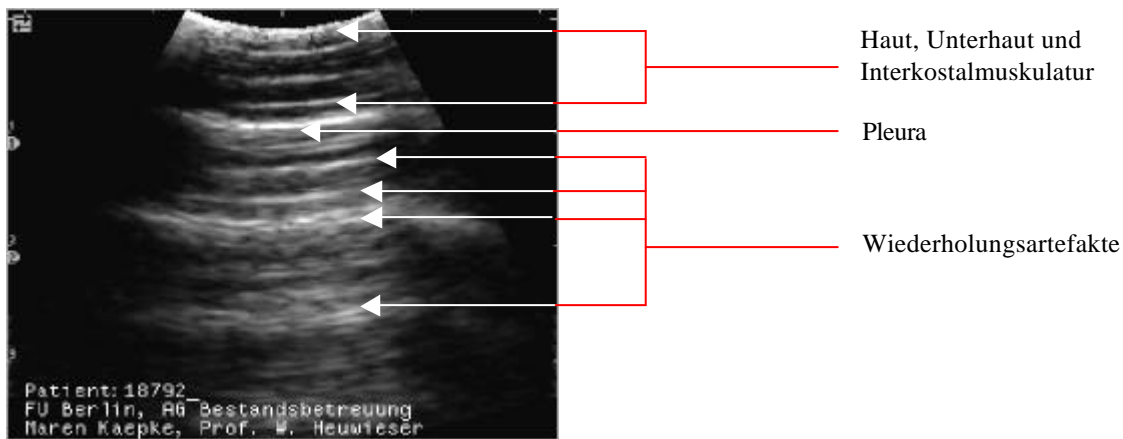


Abbildung 9: *Ultraschallbild eines gesunden Lungenbereiches (Wiederholungsartefakte)*

3.3.6.2 Verändertes Lungengewebe

In den Abbildungen 10 und 11 sind die Ultraschallbilder von zwei Kälbern dargestellt, die in dem untersuchten Lungenbereich Veränderungen aufwiesen.

Im Sonogramm des veränderten Lungenbereiches sind die verschiedenen Schichten der Brustwand, die sich als Streifen unterschiedlicher Echogenität darstellen, zu sehen.

Schallkopfnah erkennt man unter der Haut und Unterhaut die Interkostalmuskulatur. Daran

schließt sich die Pleura als hyperechogene Linie an. Bei hochgradiger Pneumonie und

kompletter Hepatisation wird die Luft aus der Lunge verdrängt. Das veränderte

Lungenparenchym weist zunehmend das Aussehen eines parenchymatösen Organs mit

leberähnlicher Struktur auf (Abbildung 11). Die Grenze zwischen der entzündlich veränderten

und der lufthaltigen Lunge ist meist unregelmäßig ausgefranst. Häufig bleiben die größeren

Bronchialzweige belüftet, die sich als reflexreiche Streifen darstellen (Abbildung 10).

Eventuell sind Gefäße oder Flüssigkeit als echoarme Strukturen im Sonogramm zu erkennen.

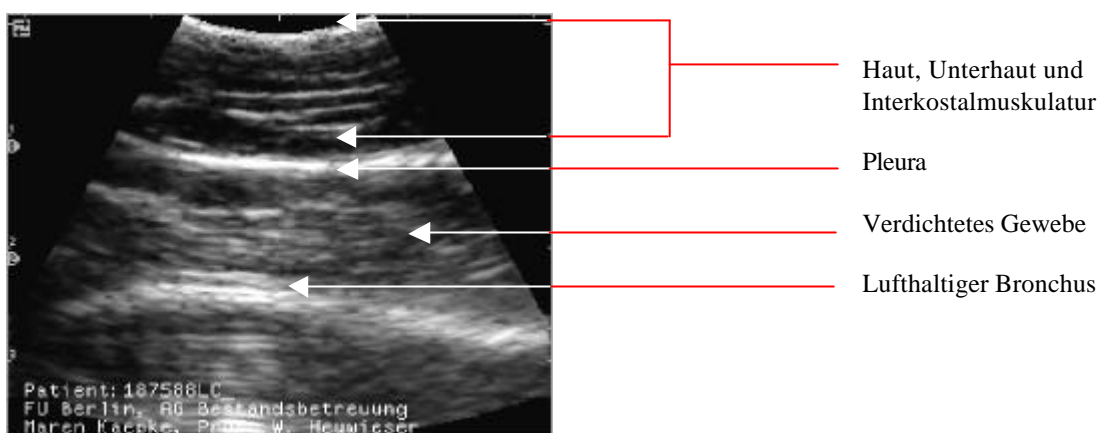


Abbildung 10: *Ultraschallbild eines veränderten Lungenbereiches (Konsolidierungen)*

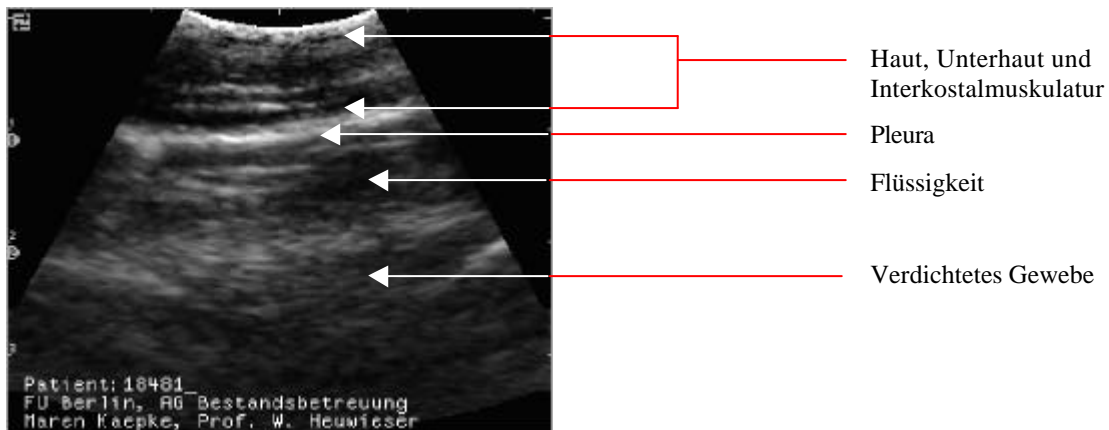


Abbildung 11: *Ultraschallbild eines veränderten Lungenbereiches (Konsolidierungen)*

3.3.7 Befunderhebung und Dokumentation bei der Ultraschalluntersuchung

3.3.7.1 Binäre Bewertung

Bei der transkutanen Ultraschalluntersuchung konnten beiderseits in acht Rippenzwischenräumen Befunde erhoben werden. Zunächst erfolgte die Bewertung der im Sonogramm dargestellten Lungenbereiche mittels einer binären Bewertung. In Tabelle 7 sind die möglichen Befunde und ihre Bewertungen zusammengefasst.

Tabelle 7: *Befundbewertung der Ultraschalluntersuchung mit binärer Bewertung*

Bewertung	Beurteilung im Ultraschallbild
0	gut belüftete Lunge → Wiederholungsartefakte
1	Konsolidierungen

Durch die Untersuchung entstanden 16 Werte. Pro Tier und Untersuchung wurden die Benotungen zusammengezählt, so dass ein Tier minimal die Punktzahl 0 und maximal 16 Punkte erreichen konnte.

Nach einiger Zeit wurde festgestellt, dass mit der binären Beurteilung (0 / 1) wenig Unterschiede zwischen den Versuchstieren selber, aber auch zwischen den Versuchs – und Kontrolltieren ermittelt werden konnten. Um eventuelle Unterschiede besser herausarbeiten zu können, wurde eine semiquantitative Befunderhebung erarbeitet und bei einem Teil der Tiere zusätzlich zu der alten Beurteilung erhoben.

3.3.7.2 Semiquantitative Bewertung

Die semiquantitative Bewertung der Ultraschallbefunde sieht eine detailliertere Beschreibung der Veränderungen vor. In Tabelle 8 sind die möglichen Befunde und ihre Bewertungen zusammengefasst.

Tabelle 8: Befundbewertung der Ultraschalluntersuchung mit semiquantitativer Bewertung

Bewertung	Beurteilung im Ultraschallbild
0	gut belüftete Lunge → Wiederholungsartefakte
1	stellenweise Konsolidierungen, stellenweise gut belüftete Lunge
2	Lufteinschlüsse im konsolidierten Gewebe
3	reine Konsolidierungen

Durch die Addition der Bewertungen an den 16 Untersuchungspunkten konnte ein Tier minimal die Punktzahl 0 und maximal die Punktzahl 48 erreichen. Eine derartige Befundbewertung wurde bei 22 Versuchstieren und 12 Kontrolltieren vorgenommen.

3.3.8 Labordiagnostische Untersuchungen

Für die Bestimmung der Entzündungsproteine wurde Blutplasma benötigt. Die Blutentnahme für die Plasmagewinnung erfolgte an der V. jugularis. Es wurden exakt 4,5 ml Blut unter Vermeidung von Schaumbildung in einem Röhrchen (Fassungsvermögen 5 ml) mit einer Citratvorlage (0,5 ml) aufgefangen. Unmittelbar nach der Entnahme wurden Antikoagulans und Blut durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens durchmischt. Die Blutproben wurden beschriftet, schnellstmöglich in das instituteigene Labor transportiert und dort weiter bearbeitet.

Das dekalzifizierte Citratblut wurde bei 1500 x g für 15 min zentrifugiert und das Plasma anschließend vorsichtig und ohne das Blutzellsediment zu berühren in ein Reagenzglas pipettiert.

3.3.9 Fibrinogen

Die gerinnungsanalytische Untersuchung erfolgte mit dem Coagulometer Biomatic 2000 (Sarstedt, Nümbrecht-Rommelsdorf, Deutschland) unmittelbar im Anschluss an die Blutentnahme.

3.3.9.1 Testprinzip

Zu einer mit Puffer (Barbital-Pufferlösung) verdünnten Citratplasmaprobe wird Thrombin im Überschuss gegeben. Unter diesen Bedingungen ist die Zeit bis zur Fibrinentstehung ausschließlich vom Fibrinogengehalt der Probe abhängig.

Das Coagulometer Biomatic 2000 misst die Gerinnungszeit von Plasma anhand der einsetzenden Viskositätsänderung. Diese wird durch die Beeinflussung der Schwingungsamplitude eines in die Probe eintauchenden Kunststoffstäbchens erfasst. Nach

Zugabe von Startreagenz führt der Eintritt der Gerinnung zu einer Erhöhung der Plasmaviskosität und somit zur Verringerung der Schwingungsamplitude. Die Gerinnungszeit wird digital in Sekunden und Zehntelsekunden angezeigt. Im Gerät ist eine Wärmequelle installiert, so dass die Reagenzgefäße und Reagenzien konstant bei 37°C temperiert werden.

3.3.9.2 Eigene Untersuchungen

Die gerinnungsanalytische Untersuchung erfolgte in direktem Anschluss an die Plasmagewinnung. Die Fibrinogenbestimmung wurde mit Multifibren® einem standardisierten, lyophilisierten Thrombin aus Rinderplasma, in einer modifizierten Methode nach Clauss (1957) vorgenommen.

Unmittelbar vor der Bestimmung wurde eine Plasmaverdünnung aus 25 µl Citratplasma und 475 µl Barbitallpufferlösung (1:20) hergestellt. Von dieser Verdünnung wurden 200 µl in ein Reagenzgefäß pipettiert und 60 Sekunden bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl des in 2 ml Aqua bidestillata gelösten Multifibren® konnte die Gerinnungszeit mit dem Coagulometer bestimmt werden. Aus einem dem Testbesteck beiliegenden Tabelle konnte anhand der gemessenen Gerinnungszeit die Fibrinogenkonzentration in mg/dl ermittelt werden. In der Originalanleitung war eine Verdünnung von 1:10 angegeben, bei den eigenen Untersuchungen wurde eine stärkere Verdünnung (1:20) gewählt. Die in der Tabelle abgelesene Gerinnungszeit musste aus diesem Grund mit 2 multipliziert werden.

Mit einem dem Testkit beiliegenden Kontrollplasma wurde regelmäßig eine Richtigkeitsprüfung vorgenommen. Die Vorschriften des Geräte- und Reagenzienherstellers wurden genau beachtet, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

3.3.10 Haptoglobin

Die Bestimmung der Haptoglobin – Konzentration erfolgte mit dem Testkit „Phase – Range™ - Haptoglobin“ der Firma Tridelta Development Limited (Greystones, Irland). Mittels einer photometrischen Messung wurde die Proteinkonzentration analysiert.

3.3.10.1 Testprinzip

Der Test ist zum Nachweis von Haptoglobin aus Serum- oder Plasmaproben von verschiedenen Spezies geeignet. Das Testprinzip basiert auf der Erhaltung der Pseudo-Peroxidase-Aktivität des Hämoglobins in Gegenwart von Haptoglobin. Das Hämoglobin selbst besitzt eine eigene Peroxidase Aktivität, welche durch einen niedrigen pH-Wert gehemmt werden kann.

In der Gegenwart von Haptoglobin entsteht jedoch ein Komplex zwischen Hämoglobin und Haptoglobin, welcher die Hemmung der Pseudo-Peroxidase-Bildung überwinden kann. So wie die Menge von Haptoglobin in einer Probe ansteigt, steigt auch die Anzahl von Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexen an und korrelierend dazu auch die Erhöhung der Peroxidase Aktivität. Daher kann die Haptoglobinkonzentration in Serum oder Plasma direkt bestimmt werden, wenn man ihn mit einer bekannten Haptoglobin Standardreihe vergleicht.

3.3.10.2 Eigene Untersuchungen

Die Plasmaproben für die Haptoglobinbestimmung wurden zunächst gesammelt und bei -23°C tiefgefroren. Das Auftauen wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt und die Probe vor dem Weiterarbeiten nochmals gründlich durchmischt.

Eine 96-Loch Mikrotiterplatte wurde im Doppelansatz mit den zu untersuchenden Blutproben beschickt. Zur Erstellung einer Eichkurve wurden ebenfalls im Doppelansatz Kalibratoren mit bekannter Konzentration aufgetragen. Danach erfolgte die Zugabe von Hämoglobin. Durch leichtes Klopfen konnte eine gute Durchmischung erzielt werden. Mittels einer automatischen Mehrkanalpipette wurde das Farbreagenz hinzugegeben. Nach 5 minütiger Inkubation wurde die Extinktion im Microplate Reader (Elx800, Bio Tek Instruments Inc., USA) bei einer Wellenlänge von 630nm abgelesen. Die Auswertung erfolgte mittels der durch die Kalibratoren erstellten Eichkurve. Für die Berechnung wurde das arithmetische Mittel der im Doppelansatz bestimmten Konzentrationen verwendet. Proben mit einem Variationskoeffizient $> 20\%$ wurden aussortiert und nochmals untersucht. Lag der Variationskoeffizient nach der zweiten Untersuchung erneut über 20% , wurden die Proben nicht in die Auswertung einbezogen. Der Intra-assay - Variationskoeffizient betrug 7,106. Die Vorschriften des Geräte- und Reagenzienherstellers wurden genau beachtet, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

3.3.11 Weitere Untersuchungen

Bei 13 Tieren (6 Versuchstieren und 7 Kontrolltieren) wurden weiterführende Untersuchungen (Nasenschleimtipfer oder Tracheobronchialsplüproben) durchgeführt. Untersucht wurde auf bakterielle (*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus somnus*, Mycoplasmen, *Arcanobacterium pyogenes*) und virale (BHV 1, BVD/MD, PI3, BRSV) Erreger.

3.3.11.1 Entnahme von Nasentupfern

Die Nasentupfer wurden stets vor einer Behandlung entnommen.

Für die virologische Untersuchung wurden sterile Nasentupfer für Rinder (Albrecht GmbH und Co. KG, Aulendorf, Deutschland) verwendet. Nach trockener Reinigung des Flotzmaules und des Nasenloches (mit Hilfe von Zellstoff oder eines trockenen, frischen Handtuchs) wurde ein steriles elastisches Tupferstäbchen so in den ventralen Nasengang eingeführt, dass der Tupfer die Nasenschleimhaut nur im Naseninneren berührte.

Nachdem das Stäbchen vollgesogen war, wurde es in gleicher Weise zurückgezogen und der Tupfer in ein Probenröhrchen überführt, wobei sekundäre Kontamination vermieden wurde. Der Stiel des Tupfers wurde bis auf eine Länge von etwa 5cm abgebrochen und das Probenröhrchen bleibend beschriftet.

Für die bakteriologische Untersuchung wurden AccuCulshure[®] - Tupfer der Fa. Albrecht verwendet, die sowohl zur Bestimmung von anaeroben als auch aeroben Keimen geeignet sind. Der Tupfer bestand aus einem Tupfersystem mit einem Kunststofftupfer, der sich innerhalb eines Dichtungssystems befand. Dieses Dichtungssystem garantierte, dass der Tupfer vor und nach der Probenentnahme vor Kontamination geschützt war. Zusätzlich war im System ein Transportmedium enthalten, welches zunächst durch eine Dichtung vom Tupfer abgetrennt war. Erst nach Entnahme der Probe, wurde der Tupfer mit dem Transportmedium zusammengebracht.

Zur Probenentnahme wurde der Tupfer kaschiert in den ventralen Nasengang eingeführt. Im Naseninneren kurzfristig hervorgeschoben, und durch kleine, reibende Bewegung die Nasenschleimhaut aufgekratzt. Nachdem der Tupfer vollgesogen war, wurde er wieder in die Ummantelung zurückgezogen und verdeckt aus der Nase entfernt. An einer Sollbruchstelle konnte der Tupfer mitsamt des Dichtungssystems gekürzt und dann in das Röhrchen mit dem Transportmedium versenkt und dauerhaft beschriftet werden.

3.3.11.2 Durchführung einer Tracheobronchialsplprobe

Die Spülung wurde mit einem Venenverweilkatheter für Kälber (Stericath[®], Eickemeyer, Kanüledurchmesser: 1,2x1,7 mm, Länge des Katheters: 30 cm) durchgeführt. Die Probennahme erfolgte stets vor der Durchführung einer Behandlung.

Das Kalb wurde mittels einer intravenösen Injektion von Rompun[®] 2% (= 0,2 mg Xylazin pro kg Körpermasse) in die Drosselvene (V. jugularis externa) anästhesiert.

Nach Eintritt der narkotisierenden Wirkung wurde das Kalb in Brustbauchlage gelegt. Ein Helfer hielt den Kopf des Kalbes nach dorsal, so dass die Trachea gestreckt wurde. In Höhe des Übergangs zwischen dem 2. und 3. Halsdrittel wurde in der Medianen eine Hautfläche von 6 x 3 cm rasiert, die rasierte Fläche mit Cutasept® und einem Tupfer gereinigt und desinfiziert.

Die Trachea wurde mit Daumen und Zeigefinger fixiert und in der Medianen gehalten. Mit dem Skalpell wurde ein ca. 2- 3 cm langer, senkrechten Hautschnitt angelegt, bis die Trachealspangen sichtbar wurden.

Die Wunde wurde erneut mit Cutasept® desinfiziert und die Kanüle des Venenkatheters horizontal zwischen 2 Trachealspangen hindurch in das Tracheallumen gestochen. Die Kanülenspitze lag korrekt im Tracheallumen, wenn Atemgeräusche am Ende des Katheterschlauchs zu hören waren. Sobald die Kanülenspitze korrekt lag, wurde die Kanüle zu 2/3 ihrer Länge (ca. 5 cm), in einem Winkel von ca. 35° nach ventral in das Tracheallumen eingeführt. Danach wurde der Katheterschlauch bis zur Aufzweigung in die Hauptbronchen vorgeschoben (bis der Widerstand stark zunahm). Die Länge des einzuführenden Schlauches konnte anhand der Distanz zwischen Einstichstelle und Bronchialaufzweigung am Körper des Kalbes vor dem Eingriff abgemessen werden. Eine auf dem Schlauch vorhandene Skalierung war zur Längenabschätzung hilfreich.

Eine mit steriler 0,9%iger Kochsalzlösung gefüllte Einmalspritze wurde auf das Ende des Katheters gesteckt, die Lösung (10 ml) zügig in die Trachea injiziert und ohne die Flüssigkeitssäule abreißen zu lassen wieder in das Spritzenlumen zurückgesogen. Dabei konnten zwischen 5 und 7 ml des Spülmediums zurückgewonnen werden. In dem Medium sollten Flocken und/oder Schlieren vorhanden sein. Dieselbe Prozedur wurde mit einer zweiten Spritze wiederholt.

Daraufhin wurde der Katheterschlauch langsam durch die Kanüle zurückgezogen, bis das Ende des Schlauches zu sehen war. Dann erst wurde die Kanüle aus der Trachea entfernt. Der Hautschnitt wurde mit ein oder zwei Knopfheften vernäht.

Der Kopf des Kalbes wurde nach dem Eingriff seitlich am Brustkorb auf Stroh gelagert. Die Spülflüssigkeit wurde in die sterilen Blutröhrchen gefüllt und dauerhaft gekennzeichnet. Der Probentransport erfolgte bis zur FU Berlin durch die Untersucherin selber, dann durch den Fahrer des Fachbereiches Veterinärmedizin. Die bakteriologischen und virologischen Untersuchungen wurden vom Berliner Betrieb für Zentrale gesundheitliche Aufgaben, Institut für Lebensmittel, Arzneimittel und Tierseuchen Berlin (ILAT) durchgeführt.

3.3.12 Dokumentation und Datenerfassung

Alle durchgeführten Untersuchungen wurden in Befundbögen dokumentiert (Anhang 1). Die Behandlungsdaten wurden aus dem Behandlungsbuch des Betriebes übernommen. Alle Daten wurden in Microsoft Excel 2000[®] für Windows übertragen und festgehalten.

3.3.13 Statistische Auswertung

Die deskriptive und analytisch statistische Auswertung wurde mit SPSS[®] (Version 10.0 für Windows) durchgeführt. Abbildungen wurden mit SPSS[®] und Excel 2000[®] für Windows angefertigt.

Die Überprüfung der Daten auf symmetrische Verteilung wurde mit Hilfe von Histogrammen durchgeführt. Die ermittelten Haptoglobinkonzentrationen streuten sehr weit. Um eine nahezu symmetrische Verteilung der Daten zu erzielen, wurden die Konzentrationen zu Basis 10 logarithmiert. Die geringste nachweisbare Konzentration lag bei 0,001 mg/ml. Für die Berechnung des dekadischen Logarithmus der Werte, die unterhalb der nachweisbaren Konzentration lagen, wurde die halbe Nachweisgrenze (0,0005 mg/ml) eingesetzt. Die deskriptive Beschreibung der Haptoglobinkonzentrationen erfolgte mittels des geometrischen Mittelwertes, des 95% Konfidenzintervall (Unter – und Obergrenze), der Minimal – und Maximalwerte, sowie der Quartile 0.25, 0.5 und 0.75.

Die Fibrinogenkonzentration, die Temperatur, die Atemfrequenz und die Daten der Ultraschalluntersuchung wurden mit Hilfe des arithmetischen Mittelwertes, der Standardabweichung, der Minimal – und Maximalwerte sowie der Quartile 0.25, 0.5 und 0.75 beschrieben.

Die deskriptive Statistik für den Clinical Score umfasst den Minimal – und Maximalwert und die Quartile 0.25, 0.5 und 0.75.

Um die Verteilung der untersuchten Tiere in Bezug auf die möglichen Ultraschallbewertungen zu interpretieren, wurden die Häufigkeiten an den einzelnen Untersuchungstagen tabellarisch dargestellt.

Bei allen analytischen Berechnungen wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den drei Behandlungsgruppen wurde der Kruskal – Wallis – H – Test für mehr als zwei unabhängige Stichproben verwendet.

Anschließend wurden die gefundenen signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen mittels des Mann – Whitney – U – Testes für zwei unabhängige Stichproben näher betrachtet.

Die Unterschiede zwischen den Studiengruppen (gesund / krank) wurden mit dem Mann – Whitney – U – Test geprüft. Dieser nichtparametrische Test für zwei unabhängige Stichproben wurde gewählt, da die Annahme der Normalverteilung nicht für alle Parameter aufrechterhalten werden konnte. Die graphische Darstellung der gefundenen Unterschiede erfolgte mittels Boxplots.

Für jeden einzelnen Parameter wurde überprüft, ob er mit den anderen untersuchten Parametern korrelierte. Dieser Zusammenhang wurde zum ersten für die zum gleichen Zeitpunkt gemessenen Parameter berechnet, zum zweiten wurden generell alle Parameter ohne Einbezug der Zeit, miteinander verglichen. Für die Berechnung wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman verwendet. Ausgewählte Zusammenhänge wurden mittels Streudiagrammen oder Boxplots abgebildet.

Zur Darstellung der Konzentrationsveränderungen von Haptoglobin und Fibrinogen nach einer Behandlung wurden für die einzelnen Behandlungsgruppen Liniendiagramme erstellt. In dem Diagramm stellt jede einzelne Linie den Konzentrationsverlauf des untersuchten Akut – Phase – Proteins eines Tieres über alle Untersuchungstage dar. Ziel war es, für jedes Tier die Änderungen der Proteinkonzentration über die fünf Untersuchungstage aufzuzeigen. Zur Darstellung der Änderung der Haptoglobin - und Fibrinogenkonzentration in den einzelnen Behandlungsgruppen wurden die Differenzen der einzelnen Konzentrationen an den Untersuchungstagen berechnet (Tag 1 – Tag 2 usw.). In Boxplots erfolgten für die einzelnen Behandlungsgruppen die Darstellung der täglichen Veränderungen der Proteinkonzentrationen.

Die Häufigkeiten für die einzelnen Bewertungskategorien der Erstbehandlung wurden tabellarisch für die gesamten Versuchstiere und für die einzelnen Behandlungsgruppen dargestellt.

Für die Bewertung der prognostischen Möglichkeiten der klinischen und labordiagnostischen Parameter (Temperatur, Atemfrequenz, Clinical Score, Haptoglobin und Fibrinogen) wurde zunächst mittels des Mann – Whitney – U – Testes ein Vergleich zwischen geheilten und nicht geheilten Tieren durchgeführt. Anschließend wurde untersucht, inwieweit die untersuchten Parameter die Vorhersagbarkeit einer erfolgreichen Behandlung verbessern. Dafür wurden die Werte, für die sich ein signifikanter Zusammenhang ergab, einer binären logistischen Regression unterzogen. Die binäre abhängige Variabel wurde mit 0 (nicht geheilt) und 1 (geheilt) codiert, Als Kovariaten wurden alle Parameter einbezogen, die sich zwischen geheilten und nicht geheilten Tieren mit $p < 0,1$ unterschieden.