

II. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patienten

Das Patientengut setzte sich aus Katzen verschiedener Rassen, verschiedenen Alters und Geschlechts zusammen. Die Katzen wurden in einem Zeitraum von Januar 1999 bis Juni 2000 in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Berlin vorgestellt. Die Patienten wurden nach folgenden Kriterien ausgesucht:

- a) Patienten, deren Blutproben per Zufall ausgewählt wurden (Ziel: die Messgenauigkeit der maschinellen Tc-zählung mit der manuellen Zählung zu vergleichen)
- b) Patienten, die in der manuellen Zählung eine Thrombozytopenie aufwiesen, d.h. Thrombozytenwerte $< 180.000 \text{ Tc}/\mu\text{l}$ (Ziel: Untersuchung der Thrombozytopenien bei der Katze)
- c) Patienten, die aus unterschiedlichen Gründen sediert wurden (Ziel: Messung der Schleimhautblutungszeit bei Katzen)

2.2 Methoden

2.2.1 Eigene Untersuchungen

2.2.1.1 Anamnese

Bei Gruppe b erfolgte nach der Aufnahme des Signalements eine genaue Anamnese, bei der unter anderem folgendes berücksichtigt wurde: Vorstellungsgrund und Symptome, Erkrankungsdauer, Haltungsform (Freigänger / Wohnungskatze, Einzeltier / andere Tiere), Vorbehandlungen durch den Haustierarzt (Medikamentengabe, Impfzeitpunkt) und Anzeichen für erhöhte Blutungsneigung / frühere Blutungsperioden.

2.2.1.2 Klinische Untersuchung

Es wurde insbesondere auf folgende Punkte geachtet: rektale Körpertemperatur, Schleimhautfarbe, kapilläre Füllungszeit, Palpation der Lymphknoten, Bestimmung der Atem- und Pulsfrequenz, Herzfrequenz und -töne, Palpation des Abdomens, Anzeichen für eine erhöhte Blutungsneigung in Haut und Schleimhäuten, Harn- und Kotabsatz sowie Harn- und Kotfarbe.

2.2.1.3 Hämatologie

Das Blut wurde aus der Vena cephalica, Vena saphena oder aus der Vena jugularis in EDTA-Röhrchen entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Blutabnahme nach nur kurzer Stauzeit möglichst an einer unbeschädigten Vene durchgeführt wurde. Die ersten 1-2 ml Blut wurden für die klinische Chemie und erst die folgenden Milliliter zur Tc-zählung verwendet. Die Blutuntersuchung war innerhalb von 30 Min. abgeschlossen.

Die hämatologische Untersuchung wurde mit dem maschinellen Multiparameter-Hämatologie-Analysegerät Cell-Dyn 3500 (Abbott, Wiesbaden) durchgeführt. Es wurden folgende Parameter ermittelt: Leukozyten-, Erythrozyten- und Tc-zahlen, MCV, MCHC, MCH, Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration (Tab. 1). Ebenso wurde ein maschinelles und zum Teil auch ein manuelles (Blutausstrich mit Färbung nach Pappenheim) Differentialblutbild erstellt (Tab. 1).

Tab. 1: Referenzbereiche nach Kraft et al. (1999)

Die Tc werden in dieser Arbeit in der konventionellen Einheit (/ μ l) angegeben, die Umrechnung in die SI-Einheit erfolgt mit dem Faktor 0,001.

Parameter	SI-Einheit	Referenzbereich
Hämatokrit	l/l	0,30-0,44
Hämoglobin	mmol/l	5,6-9,3
Erythrozyten	T/l	5-10
MCHC	mmol/l	19-22
MCH	fmol	0,8-1,0
MCV	fl	40-55
Tc	G/l	180-550
Leukozyten	G/l	6-11 (ruhiges Tier) (-18 aufgeregtes Tier)
Neutrophile segmentkernige Granulozyten	% ; G/l	60-78; 3-11
Neutrophile stabkernige Granulozyten	% ; G/l	0-4; bis 0,6
Eosinophile Granulozyten	% ; G/l	0-6; 0,04-0,6
Basophile Granulozyten	% ; G/l	bis 1; bis 0,04
Lymphozyten	% ; G/l	15-38; 1-4
Monozyten	% ; G/l	0-4; bis 0,4-0,5

2.2.1.4 Thrombozytenzählung mittels Cell-Dyn 3500

Die Zählung der Tc erfolgte nach dem Prinzip der Impedanzmessung. Das Blut wird zunächst auf eine Konzentration von 1:10.812 verdünnt und anschließend mittels Vakuum durch eine Messöffnung gesaugt. An dieser Messöffnung wird der Widerstand der durchströmenden Zellen gemessen, die Tc durch den Widerstand erkannt und gezählt.

2.2.1.5 Manuelle Thrombozytenzählung

Die manuelle Tc-zählung erfolgte visuell mikroskopisch in einer Zählkammer nach Neubauer. Für die Zählung wurde ein Thrombo Plus[®]-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) mit 100µl EDTA-Blut beschickt. Der Inhalt des Röhrchens wurde mit dem Blut vermischt. Die Hämolyse erfolgte direkt nach Zugabe des Blutes. Die Zählkammer wurde mit dem am Stopfen des Thrombo Plus[®]-Röhrchens befindlichen Probenträgers gefüllt. Eine Auszählung der Tc erfolgte unter einem Phasenkontrastmikroskop nach 5 bis 10 Min. Sedimentation in 5 Gruppenquadraten. Die Tc stellten sich entweder als dunkle Körper mit hellem Hof oder als leuchtende Körper dar. Lagen Tc-aggregate vor, wurden die zusammengeballten Tc annäherungsweise gezählt. Das Zählresultat wurde mit dem Faktor 1.000 multipliziert, um die Anzahl an Tc/µl Blut zu erhalten.

2.2.1.6 Plasmatische Gerinnung

Zur Bestimmung der plasmatischen Gerinnung wurde verdünntes Zitratplasma (Mischungsverhältnis: 1 Teil Na-Zitrat 3,13% und 9 Teile Vollblut) eingesetzt. Die Ermittlung der Prothrombinzeit (PT) und der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) erfolgte mit dem Koagulometer nach Schnitger und Gross (Amelung, Lemgo).

Zur Bestimmung der PT wurde die Reagenz „Hepato Quick“ (Boehringer, Mannheim) und zur Ermittlung der PTT die Reagenz „Pathromtin“ (Dade Behring, Marburg) eingesetzt. Als Referenzbereich wurden laboreigene Werte herangezogen: PT: 16-27 Sek. und PTT: 14-25 Sek..

2.2.1.7 Klinisch-chemische Blutuntersuchung

Die Bestimmung von Natrium (Na⁺), Kalium (K⁺), Glukose (Glc) und Harnstoff (Hst) erfolgte mit dem Electrolyte-14+-Analyzer (Nova biomedicals, Rödermark) und die Ermittlung von Calcium (Ca), Phosphat (P), Kreatinin (Krea), Alanin-Aminotransferase (ALT), Alkalische Phosphatase (AP), Aspartat-Aminotransferase (AST), Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), Bilirubin (Bili), Cholesterin (Chol), Protein und Albumin (Alb) mit

dem Analysegerät Cobas Mira Plus (Roche Diagnostica, Grenzach-Wyhlen) aus Heparinplasma.

Die Referenzwerte sind in Tab. 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Referenzwerte nach Kraft¹ et al. (1999), Referenzwerte nach Tvedten² (1999), Referenzwert nach Hofmann und Lutz³ (2003)

Parameter	Einheit	Referenzbereich
Alanin-Aminotransferase	IU/l	-70 ¹
Albumin	g/l	30-46 ²
Alkalische Phosphatase	IU/l	-81 ²
Aspartat-Aminotransferase	IU/l	-30 ¹
Bilirubin gesamt	μmol/l	-3,4 ¹
Calcium	mmol/l	2,3-3 ¹
Cholesterin	mmol/l	1,8-3,9 ¹
Gesamteiweiß	g/l	55-77 ²
GLDH	IU/l	-6 ¹
Glukose	mmol/l	3,1-6,9 ¹
Harnstoff	mmol/l	5,0-11,3 ¹
Kalium	mmol/l	3,8-5,4 ³
Kreatinin	μmol/l	168 ¹
Natrium	mmol/l	145-158 ¹
Phosphat	mmol/l	0,8-1,9 ¹

2.2.1.8 FIV- und FeLV-Serologie

Die Untersuchung auf FIV und FeLV erfolgte durch den FASTest[®] der Firma Mega Cor (Hörbranz, Österreich) zum qualitativen Nachweis von AK gegen das FIV bzw. Antigen des FeLV in Vollblut-, Plasma- und Serumproben von Katzen. Positive Ergebnisse wurden z.T. durch ein Fremdlabor (Laboklin, Bad Kissingen) gesichert. Dieses Labor weist mittels eines ELISA virale Antigene des FeLV (p27 und p41) bzw. AK gegen FIV (gegen p24 und p47) nach.

2.2.1.9 FIP-Serologie

Diese Untersuchung wurde in Fremdlaboren durchgeführt. Mittels Immunfluoreszenz wurde der Titer gegen Coronaviren bestimmt (Laboklin, Bad Kissingen). Das Institut für Veterinär-Pathologie (Leipzig) untersuchte das Vorliegen von FIP-Immunkomplexen mittels ELISA.

2.2.1.10 Röntgen- und Ultraschalluntersuchungen

Von Thorax und Abdomen wurden bei den meisten Katzen Röntgenaufnahmen im latero-lateralen und ventro-dorsalen Strahlengang angefertigt. Das Abdomen wurde zusätzlich mittels Ultraschall untersucht.

2.2.2 Weiterführende Untersuchungen

2.2.2.1 Thrombozytenggebundene Antikörper (Tc-geb. AK)

Diese Untersuchung wurde von der Arbeitsgruppe Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Die Blutproben wurden dazu über Nacht ungekühlt versandt. Als Testprinzip lag dem Nachweis thrombozytenggebundener AK die Durchflusszytometrie mit Doppelfluoreszenz (Gerät: FACScan, Becton Dickinson, New Jersey USA) zugrunde. Zunächst wurde die Tc-population aufgrund der Größe und Komplexität, bestehend aus Granularität und Oberflächenrelief der Tc, definiert. Mit einem phycoerythrin-konjugierten monoklonalen AK (R-Phycoerythrin-conjugated AffiniPure F[ab] Fragment Goat Anti-Mouse IgG [H+L]) (Dianova, Hamburg) gegen Tc-antigene wurden die eigentlichen Tc ermittelt und so von thrombozytenähnlichen Fragmenten unterschieden. Mittels einem affinitätschromatographisch gereinigten und fluoreszeinkonjugierten polyklonalen AK aus der Ziege (Fluoreszein [DTAF]-conjugated AffiniPure Goat Anti-Cat IgG [H+L]) (Dianova, Hamburg) mit Spezifität gegen die schweren Ketten der felines Immunglobuline G und die leichten Ketten der anderen Immunglobuline wurden diejenigen Tc erkannt, die mit körpereigenen AK beladen waren. Mit jeder Patientenprobe wurde gleichzeitig Blut einer gesunden Kontrollkatze (gleiche Behandlung des Blutes, d.h. am selben Tag abgenommen, mit der Patientenprobe gelagert und verschickt) mituntersucht.

2.2.2.2 Direkter Coombs-Test

Mit diesem Test, der von der Arbeitsgruppe Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt wurde, werden AK gegen IgG und IgM und/oder Komplement C3 auf der Erythrozytenmembran in einem Kaltansatz bei 4° C und einem Warmansatz bei 37° C nachgewiesen.

Zunächst werden die Patientenerythrozyten mit einer Pufferlösung (Phosphate Buffered Saline [Dolbecco, Firma Biochrom, Berlin]) gewaschen, zentrifugiert und das Erythrozytenkonzentrat in unterschiedlichen Stufen verdünnt. Später werden monospezifische Antiseren (feline IgG [goat-anti-cat IgG der Firma Dianova, Hamburg], IgM [goat-anti-cat IgM der Firma Bethyl, Montgomery/Texas, USA] und C3 [sheep-anti-cat C3 der Firma The binding site GmbH, Heidelberg]) zu der Verdünnungsreihe gegeben. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde in Mikrotiterplatten (Firma Sarstedt, Nümbrecht) kann der Test abgelesen werden. Der Test ist negativ, wenn sich in den Mikrotiterplatten ein scharf begrenzter Erythrozytenknopf gebildet hat; er ist positiv, wenn eine Agglutination der Erythrozyten stattgefunden hat.

2.2.2.3 Eisenbestimmung im Serum

Diese Untersuchung wurde von einem Fremdlabor (Laboklin, Bad Kissingen) durchgeführt. Die angegebenen Referenzwerte für Eisen liegen bei 19,7-30,4 $\mu\text{mol/l}$.

2.2.2.4 Erythropoetinbestimmung im Serum

Die Erythropoetinbestimmung wurde von der Arbeitsgruppe Immunologie, Tierärztliche Hochschule Hannover durchgeführt. Die Referenzwerte liegen bei der Katze bei 0-20 IU/l.

2.2.2.5 Knochenmarkuntersuchung

Das Knochenmark wurde meist aus dem Tuberculum majus humeri, zum Teil auch aus den Darmbeinflügeln entnommen. Die Knochenmarkaspiration fand unter Allgemeinnarkose (Injektionsnarkose mit Diazepam 0,5 mg/kg und Ketamin 10-20 mg/kg Körpergewicht) statt. Die Punktionsstelle wurde geschoren und desinfiziert und nach einer Hautinzision wurde die Punktionskanüle unter drehenden Bewegungen in den Knochen getrieben. Nach Entfernung des Mandrins wurde eine Einwegspritze mit ca. 0,2 ml 3,13%igem Natriumzitat aufgesetzt und mehrmals ruckartig aspiriert. Das gewonnene Knochenmark wurde sofort auf Objektträger ausgestrichen, nach May-Grünwald gefärbt und nach Keller (1985) beurteilt (Tab. 3).

Tab. 3: Beurteilung der Megakaryopoese nach Keller (1985)

Megakaryozyten pro Gesichtsfeld (Vergrößerung: x 150):	Beurteilung:
0 bis <0,1	ungenügende Megakaryopoese
0,1 bis < 0,15	noch nicht beurteilbar
0,15 bis < 0,20	Megakaryopoese ausreichend
0,20 bis < 1,00	adäquate Megakaryopoese
1,00 bis 3,00 (> 3,00)	Megakaryopoese gesteigert

2.2.2.6 Analyse von Körperhöhlenergüssen

Die Punktion von Körperhöhlen erfolgte nach Desinfektion der Punktionsstelle. Das gewonnene Material wurde auf Farbe, Transparenz und Konsistenz makroskopisch beurteilt und das Gesamteiweiß und spez. Gewicht mittels Refraktometer bestimmt. Zusätzlich wurde die Zahl kernhaltiger Zellen bestimmt (Zählkammer nach Neubauer), ein Direkt- oder Sedimentausstrich angefertigt, nach Pappenheim gefärbt und eine zytologische Untersuchung durchgeführt.

2.2.2.7 Zytologie

Nach Desinfektion der Haut wurden Organe, Lymphknoten oder Massen punktiert. Die Feinnadelaspirate wurden auf Objektträgern ausgestrichen, fixiert (Lufttrocknung) und gefärbt. Anschließend wurde die Zellmorphologie mikroskopisch beurteilt.

2.2.2.8 Histopathologische Untersuchung

Wurde der Patient euthanasiert oder verstarb das Tier, so wurde nach Möglichkeit eine pathologische und histologische Untersuchung (Institut für Veterinär-Pathologie, FU Berlin) durchgeführt.

2.2.2.9 Schleimhautblutungszeit (*Buccal mucosa bleeding time = BMBT*)

Als BMBT definiert man die Zeitspanne, die von dem Setzen einer kleinen, definierten Wunde mit anschließender Blutung bis zum Stillstand dieser Blutung vergeht.

Mit einem sterilen, zum Einmalgebrauch bestimmten Testgerät (Simplat[®] Pediatric, Organon Teknika Corporation, Durham, North Carolina) wurde ein gleichmäßiger, d.h. in Länge und Eindringtiefe standardisierter Schnitt (3 mm x 0,5 mm) gesetzt. Dazu befanden sich die Tiere in Seitenlage und waren sediert (0,5 mg/kg Diazepam i.v., 10-20 mg/kg Ketamin i.v.). Die

rechte Oberlippe wurde nach oben geklappt und in dieser Position fixiert, indem eine Gaze durch das Maul geführt wurde. Die Enden der Gaze wurden hinter dem linken Ohr straff angezogen und verknotet. Nach einer halben Minute Stauzeit wurde der Schnäpper an der Lefzenschleimhaut angesetzt, der Mechanismus ausgelöst und eine Sekunde gehalten. Danach wurde alle 5 Sek. das austretende Blut mit einem Filterpapier aufgesaugt, ohne den Wundrand zu berühren. Das Ende der Blutungszeit war erreicht, wenn kein Blut mehr aus der Inzision austrat. Die Gazeschlinge wurde gelöst und die Prozedur auf der anderen Seite erneut durchgeführt und aus beiden Messungen der Mittelwert genommen.

2.3 Statistik

Die Statistik wurde mit dem SPSS-10-Programm für Windows (Microsoft®) durchgeführt. Zum Einsatz kam der nichtparametrische U-Test nach Mann und Whitney. Der U-Test von Mann und Whitney dient dem Vergleich zweier unabhängiger Stichproben, die nicht die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllen müssen.

Weiterhin wurden Mittelwert, Minimum, Maximum, Spannweite, Median, Standardabweichung, Korrelation, Bestimmtheitsmaß, korrigiertes Bestimmtheitsmaß und der Standardfehler des Schätzers bestimmt und z.T. in Grafiken dargestellt (z.B. Boxplots).

Die Auswertung der Daten aus dem Methodenvergleich erfolgte mit Hilfe des modifizierten Verfahrens nach Bland-Altman (BLAND und ALTMAN, 1986). Das Verfahren wird bei Vergleichsuntersuchungen eingesetzt, z. B. bei einem Vergleich eines neuen Gerätes mit einem Standardgerät. Dazu werden in einem Streudiagramm die Differenzen der durch zwei verschiedene Methoden ermittelten Werte gegen ihren Mittelwert aufgetragen. Bei der vorliegenden Untersuchung wurden die Ergebnisse der manuellen Thrombozytenzählung als Standardmethode als „richtiger Wert“ angesehen und der Cell-Dyn 3500 anhand dieser Werte evaluiert. Dies führte zu einer Modifikation des Bland-Altman-Verfahrens: die Differenzen der durch die zwei verschiedenen Methoden ermittelten Werte wurden gegen den Wert der Referenzmethode aufgetragen.