

Aus der Klinik für Klautiere des Fachbereichs Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zum Einsatz der NEFA und der BHB zur  
Stoffwechselüberwachung von Transitkühen unter  
besonderer Berücksichtigung von gepoolten  
Serumproben**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Stefan Borchardt**  
Tierarzt aus Berlin

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3405

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Holger Martens

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

cattle, dairy cows, metabolic profiling, nonesterified fatty acids, ketosis,  
sample processing, sampling techniques

Tag der Promotion: 28.10.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen  
Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über  
<<http://dnb.ddb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-870-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder  
Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in  
irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet,  
vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch  
ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der  
Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von  
jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written  
authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

## **Für meine Eltern**

"We see clearly how much a matter of indifference it is whether a theory or doctrine is right, provided, it incites to work and results in the discovery of new facts."

E. Duclaux, 1920



---

# Inhalt

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1.	Bedeutung der Transitperiode.....	3
2.2.	Ketose und Leberverfettung als Störungen der Adaptation an die NEB.....	4
2.2.1.	Ketose und Hyperketonämie.....	5
2.2.1.1.	Inzidenz und Risikofaktoren der Ketose.....	5
2.2.1.2.	Pathophysiologie der hepatischen Ketogenese.....	5
2.2.2.	Leberverfettung.....	6
2.2.2.1.	Inzidenz und Risikofaktoren für die Leberverfettung.....	7
2.2.2.2.	Pathophysiologie der Leberverfettung.....	8
2.3.	Pathophysiologische Wirkung der NEFA.....	10
2.3.1.	Pathophysiologischer Einfluss der NEFA auf die Fruchtbarkeit.....	11
2.3.2.	Pathophysiologischer Einfluss der NEFA auf die biologische Wirkung von Insulin.....	13
2.3.3.	Pathophysiologischer Einfluss der NEFA auf das Immunsystem.....	14
2.4.	Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels.....	15
2.4.1.	Ausgewählte Parameter zur Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels.....	15
2.4.2.	Präanalytische Einflüsse bei der Bestimmung der NEFA und der BHB.....	17
2.4.2.1.	Diurnale Dynamik der NEFA und der BHB.....	18
2.4.2.2.	Präanalytischer Einfluss der Probenentnahme und –behandlung auf die NEFA und die BHB.....	19
2.4.3.	Überwachung der Stoffwechselgesundheit durch die NEFA und die BHB in der Transitperiode.....	22
2.4.3.1.	Einzeltierüberwachung – ante partum.....	23
2.4.3.2.	Einzeltierüberwachung – post partum.....	26
2.4.3.3.	Stoffwechselüberwachung auf Herdenebene.....	29
2.4.3.3.1.	Stichprobentestverfahren unter Verwendung der Anzahl an Tieren mit abnormen Werten in der Stichprobe.....	31
2.4.2.3.2.	Stichprobentestverfahren unter Verwendung des Mittel- oder Poolwertes der Stichprobe.....	32

<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>
3.1.	Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Variablen auf die labordiagnostischen Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind.....	35
3.2.	Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	36
3.3.	Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	37
3.4.	Untersuchung der Poolproben.....	38
3.5.	Bestimmungsmethoden in den Versuchen.....	39
3.6.	Biostatistische Auswertung.....	40
3.6.1.	Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Variablen auf die labordiagnostische Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind.....	40
3.6.2.	Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	41
3.6.3.	Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	41
3.6.4.	Untersuchung der Poolproben.....	42
3.6.4.1.	Deskriptive Statistik der Einzel-, Mittel und Poolwerte.....	42
3.6.4.2.	Vergleich von Mittel- und Poolwerten.....	42
3.6.4.3.	Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und der Anzahl an Tieren über dem Referenzwert in der Stichprobe.....	43
3.6.4.4.	Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten und größten Einzelwert in der Stichprobe.....	43
3.6.4.5.	Ermittlung von Referenzwerten für gepoolte Serumproben der NEFA und der BHB.....	44
3.6.4.5.1.	Definition einer Referenzpopulation an Hand des Anteils an gestörten Tieren in der Stichprobe.....	44
3.6.4.5.2.	Definition einer Referenzpopulation an Hand der Schiefe der Verteilungsfunktion der Poolproben.....	44
3.6.4.5.3.	Anwendung von parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen zur Berechnung von Referenzwerten.....	45
3.6.4.5.4.	Anwendung der ROC-Kurvenanalyse zur Berechnung von Referenzwerten.....	45
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
4.1.	Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Variablen auf die labordiagnostischen Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind.....	47
4.1.1.	Einfluss der Tiefgefrierung des Serums für 24 Stunden auf die Bestimmung der NEFA und der BHB.....	47
4.1.2.	Einfluss der Lagerung des Serums für 12 und 24 Stunden bei Raumtemperatur auf die Bestimmung der NEFA und der BHB.....	49

4.1.3.	Einfluss der Lagerung des Serums im Kühlschrank für 1, 3, 5 und 7 Tage auf die Bestimmung der NEFA und der BHB.....	50
4.1.4.	Einfluss des Antikoagulanzen auf die Bestimmung der NEFA und der BHB.....	51
4.1.5.	Einfluss des Blutprobenentnahmeortes auf die Bestimmung der NEFA und der BHB...	52
4.1.6.	Einfluss der Lagerung von Vollblut ohne Antikoagulanzen, EDTA-Vollblut und Heparin-Vollblut für 24 Stunden bei Raum- oder Kühlschranktemperatur auf die Bestimmung der NEFA und der BHB.....	54
4.2.	Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	56
4.2.1.	Tagesdynamik der NEFA und der BHB 1 Woche ante partum.....	56
4.2.2.	Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Frühlaktation.....	58
4.3.	Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	62
4.4.	Untersuchung der Poolproben.....	67
4.4.1.	Anzahl der Proben je Pool/Betrieb.....	67
4.4.2.	Einzelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum.....	67
4.4.3.	Pool- und Mittelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum.....	70
4.4.4.	Prüfung auf Normalverteilung.....	72
4.4.5.	Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwerten.....	72
4.4.5.1.	Lineare Regression.....	72
4.4.5.2.	Bland-Altman Methodenvergleich.....	73
4.4.6.	Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und der Anzahl Tieren über dem Referenzwert in der Stichprobe.....	76
4.4.7.	Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten und größten Einzelwert in der Stichprobe.....	77
4.4.8.	Ermittlung von Referenzwerten für gepoolte Serumproben der NEFA und der BHB.....	79
4.4.8.1.	Definition einer Referenzpopulation an Hand des Anteils an gestörten Tieren in der Stichprobe.....	79
4.4.8.2.	Definition einer Referenzpopulation an Hand der Schiefe der Verteilungsfunktion der Poolproben.....	80
4.4.8.3.	Anwendung von parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen zur Berechnung von Referenzwerten.....	82
4.4.8.4.	ROC-Kurvenanalyse.....	85
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>89</b>
5.1.	Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Variablen auf die labordiagnostischen Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind.....	89
5.2.	Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	92

5.3.	Dynamik der NEFA und der BB in der Transitperiode.....	94
5.4.	Untersuchung der Poolproben.....	96
5.4.1.	Stichprobenplanung.....	96
5.4.2.	Einzelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum.....	97
5.4.3.	Pool- und Mittelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum.....	98
5.4.4.	Verteilung der untersuchten Parameter.....	99
5.4.5.	Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwerten.....	99
5.4.5.1.	Lineare Regression.....	99
5.4.5.2.	Bland-Altman Methodenvergleich.....	100
5.4.6.	Zusammenhang zwischen dem Poolwert und der Anzahl an Tieren über dem Referenzwert. ....	101
5.4.7.	Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten und größten Einzelwert in der Stichprobe.....	102
5.4.8.	Ermittlung von Referenzwerten für die Verwendung von Poolproben.....	103
5.4.8.1.	Definition einer Referenzpopulation an Hand des Anteils an gestörten Tieren in der Stichprobe.....	104
5.4.8.2.	Definition einer Referenzpopulation an Hand der Schiefe der Verteilungsfunktion der Poolproben.....	106
5.4.8.3.	Anwendung von parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen zur Berechnung von Referenzwerten.....	107
5.4.8.4.	ROC-Kurvenanalyse.....	107
5.4.8.5.	Gegenüberstellung der Methoden zur Ermittlung von Referenzwerten für gepoolte Serumproben der NEFA und der BHB.....	109
5.5.	Abschließende Betrachtung und Hinweise zur Interpretation von Stoffwechseluntersuchungen unter Verwendung von gepoolten Serumproben der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum.....	112
5.6.	Schlussfolgerungen.....	117
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>120</b>
<b>7.</b>	<b>Summary.....</b>	<b>122</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>125</b>
<b>9.</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen.....</b>	<b>145</b>
<b>10.</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen.....</b>	<b>148</b>



<b>11.</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>152</b>
<b>12.</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>153</b>



## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

a	Konstante im Regressionsmodell	r	Korrelation
ACC	AcetylCoA-Carboxylase	R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
$\alpha$	alpha, Fehler erster Art	Ret.Sec.	Retentio Secundinarum
a.p.	ante partum	RR	Relatives Risiko
ATP	Adenosintriphosphat	RT	Raumtemperatur
AUC	Area under curve	s	Standardabweichung
BCS	Body Condition Score	SCK	subclinical ketosis
b	Regressionskoeffizient	Se	Sensitivität
$\beta$	beta, Fehler zweiter Art resp. Standardisierter Regressionskoeffizient	Sp	Spezifität
$\beta$ -HB-DH	$\beta$ -Hydroxybuttersäure- Dehydrogenase	SS	Stearinsäure
BHB	$\beta$ -Hydroxybuttersäure	TAG	Triacylglycerol
BP	Blutprobe	TG	Tiefgefrierung
CK	clinical ketosis	TM	Trockenmasse
CPT-I	Carnitin-Palmitoyl-Transferase 1	TMR	Totale Misch Ration
DAG	Diacylglycerol	VLDL	Very Low Density Lipoproteins
E2	Östrogen	ZF	Zentrifugation
EDTA	Ethylendiamintetraacetat		
GIT	Gastrointestinaltrakt		
GPAT	Glycerol-3-Phosphat- Acyltransferase		
HMG-CoA	Hydroxymethyl-Glutaryl-CoA		
IGF-I	Insulin-like-Growth-Factor-1		
LMV	Labmagenverlagerung		
LR	Likelihood Ratio		
NaF	Natrium-Fluorid		
NEB	negative Energiebilanz		
NEFA	nonesterified fatty acids		
n.s.	nicht signifikant		
OR	Odds Ratio		
OS	Ölsäure		
p	Signifikanzniveau		
P4	Progesteron		
PMN	Polymorphkernige Granulozyten		
p.p.	post partum		
PreV+	positiver prädiktiver Wert		
PreV-	negativer prädiktiver Wert		
PS	Palmitinsäure		



## 1. Einleitung

Die subklinischen Stoffwechselstörungen haben einen großen Einfluss auf die Ökonomie der Milchproduktion innerhalb einer Herde. Die Inzidenz der subklinischen und klinischen Stoffwechselstörungen ist am größten in der Transitphase. Die meisten subklinischen Erkrankungen bleiben verborgen und führen zu anhaltenden negativen Effekten für die Herdengesundheit, -fruchtbarkeit und -leistung, welche die ökonomischen Verluste für die klinischen Erkrankungen übersteigen. Die hohe Erkrankungsinzidenz reflektiert hierbei die fehlgeschlagene Adaptation an die metabolischen Herausforderungen in der Transitperiode auf den Ebenen des Säure-Base-Haushaltes, des Mineralstoffwechsels und des Energie- und Fettstoffwechsels. Insbesondere die Anpassung des Energiestoff- und Fettstoffwechsels mit der Mobilisierung und adäquaten Verwertung körpereigener Fettreserven in Form der „Nicht veresterten freien Fettsäuren“ (nonesterified fatty acids: **NEFA**) ist eine wesentliche Voraussetzung für das Erreichen einer hohen Milchleistung, da der steigende Energiebedarf in den ersten Wochen der Laktation nicht über die Futtermittelaufnahme gedeckt werden kann. Eine Fehlanpassung resultiert in dem Krankheitskomplex der subklinischen Ketose (**SCK**) und ist verbunden mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko in der Früh-laktation sowie einer verringerten Milch- und Reproduktionsleistung.

Dabei stellt der subklinische Charakter hohe Anforderungen an die Diagnostik in der Bestandsbetreuung von Milchviehherden. Neben der Auswertung der Milchleistungsdaten und der Beurteilung der Körperkondition kann die Labordiagnostik genutzt werden, um den diagnostischen Prozess zu unterstützen.

Zur Anwendung kommen Stoffwechselprofile, die eine Kombination aus verschiedenen Laborparametern darstellen und auf Herdenebene als Stichprobentestverfahren durchgeführt werden. Von zentraler Bedeutung sind hierbei die NEFA und die  $\beta$ -Hydroxybuttersäure (**BHB**). Der Erfolg und Nutzen der Stoffwechselprofile hängt von verschiedenen Faktoren ab.

Zum einen müssen die Veränderungen der metabolischen Parameter Ausdruck der Stoffwechselgesundheit der Herde sein und nicht durch andere Einflussfaktoren verursacht werden. Hierbei kommen genetische, biologische, physiologische, prandiale, saisonale und analytische Einflussfaktoren in Betracht. Das methodische Ziel bei der Verwendung von Stoffwechselprofilen muss daher sein, alle Einflüsse, die nicht in Verbindung mit der Stoffwechselgesundheit der Herde stehen, zu minimieren.

Zum anderen bedarf es spezieller Referenzwerte, welche die Laktationsdynamik der Stoffwechselparameter berücksichtigen und qualitativ geeignet sind, um stoffwechselgesunde von stoffwechselgestörten Herden zu unterscheiden.

Die Auswertung der metabolischen Profile erfolgt entweder über den arithmetischen Mittelwert einer Stichprobe oder über den Anteil an Tieren in der Stichprobe, die von einem Einzeltierreferenzwert abweichen. In beiden Fällen ist die individuelle Laboranalyse aller Tiere erforderlich. Bei einer hohen

Tierzahl und einer Vielzahl an Laborparametern sind diese Methoden sehr kostenintensiv. Die hohen Kosten sind einer der Gründe, warum routinemäßige Stoffwechseluntersuchungen nur wenig verbreitet sind. Der Gebrauch von gepoolten Proben stellt eine aussichtsreiche Methode dar, um diese Kosten zu reduzieren. Allerdings mangelt es an wissenschaftlicher Evidenz und Vertrauen in die Poolproben, so dass dieses Verfahren auf breite Ablehnung stößt.

Unter Verwendung der NEFA und der BHB zur Beurteilung des Energiestoffwechsels soll geklärt werden, welche Einflüsse es bei der Probenentnahme und -verarbeitung zu beachten gilt. Weiterhin soll das diagnostische Potential der Stoffwechseluntersuchung unter Verwendung von gepoolten Serumproben validiert werden. Die Ergebnisse des Poolverfahrens sollen mit den gängigen Verfahren der individuellen Laboranalyse verglichen werden. Schließlich sollen in dieser Arbeit Referenzkriterien und Interpretationsempfehlungen für die Verwendung von gepoolten Serumproben der NEFA und der BHB erarbeitet werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Bedeutung der Transitperiode

Die Transitperiode wird definiert als der Zeitraum drei Wochen vor bis drei Wochen nach dem Partus (Abb. 1). Dabei stellt der Übergang vom trächtigen, nicht-laktierenden Status zum nicht-trächtigen, laktierenden Status eine große physiologische Herausforderung für die Adaptationsfähigkeit des Stoffwechsels der Milchkuh dar (Goff und Horst 1997).

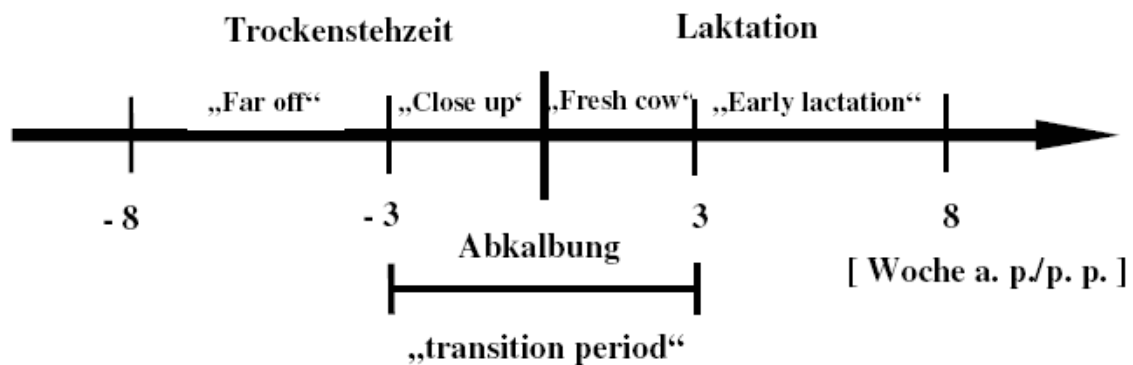


Abbildung 1: Definition der Transitperiode (Grummer 1995; Drackley 1999)

Der Nährstoffbedarf steigt mit Beginn der Laktation (30kg/d Milchleistung am 4.d p.p.) für Glukose um das 2,7-fache, für Aminosäuren um das 2-fache und für Fettsäuren um das 4,5fache gegenüber der späten Trächtigkeit (280.d der Gravidität) (Bell 1995). Der Energiebedarf steigt dabei um das 3-fache. In diesen Zeiten des gesteigerten Bedarfs sinkt die relative TM-Aufnahme zum Partus von 1,7% (relativer Anteil des Körpergewichts) auf 1,3% für primipare Kühe und von 2,0% auf 1,4% für pluripare Kühe im Vergleich zur antepartalen TM-Aufnahme (Grummer et al. 2004). Die Anforderungen an die Adaptationsfähigkeit der verschiedenen Stoffwechselebenen zur Bereitstellung der Nährstoffe sind dementsprechend hoch. Es wird eine koordinierte biologische Regulation verschiedener Gewebe benötigt (Tab. 1), um das genetische Potential für die Milchleistung auszunutzen und gleichzeitig die physiologischen Mechanismen der Homöostase aufrechtzuerhalten (Bauman und Currie 1980; Bell 1995). Die erfolgreiche Adaptation an die negative Energiebilanz (**NEB**) ist hierbei von zentraler Bedeutung für das Erreichen einer hohen Milchleistung bei stabiler Gesundheit und Fruchtbarkeit (Drackley 1999; Herdt 2000a; Ingvarsen 2006). Die Fähigkeit, diese metabolische Herausforderung zu bewältigen, variiert zwischen den einzelnen Individuen (Kessel et al. 2008).

Die Mehrzahl der metabolischen (Hypocalcämie, Ketose, Leberverfettung) und infektiösen (Mastitis, Metritis, Endometritis) Erkrankungen manifestieren sich in der Transitperiode. Diese vermehrte

Erkrankungsinzidenz reflektiert hierbei die fehlgeschlagene Adaptation mit anhaltenden negativen Folgen über die Transitperiode hinaus (Ingvarlsen et al. 2003; Jorritsma et al. 2003).

Tabelle 1: Wichtige biologische Prozesse und Stoffwechselalterationen beim Übergang zur Laktation (Bauman und Currie 1980)

Prozess/Stoffwechsel	Gewebe	Aktion
<b>Milchsynthese</b>	<b>Euter</b>	↑ Anzahl sekretorischer Zellen
		↑ Blutfluss
		↑ Nährstoffverbrauch
<b>Fettstoffwechsel</b>	<b>Fettgewebe</b>	↓ de novo Fett-Synthese
		↓ NEFA-Absorption
		↓ Veresterung von NEFA
		↑ Lipolyse
	<b>Körpergewebe</b>	↑ Lipide als Energieresource
<b>Glukosestoffwechsel</b>	<b>Leber</b>	↑ Größe der Leber
		↑ Blutfluss
		↑ Glukoneogenese
	<b>Körpergewebe</b>	↓ Glukose als Energieresource
<b>Proteinstoffwechsel</b>	<b>Muskelgewebe</b>	↓ Proteinsynthese
		↑ Proteolyse
	<b>Körpergewebe</b>	↑ Proteinsynthese
<b>Mineralstoffwechsel</b>	<b>Darm</b>	↑ Absorption
	<b>Knochen</b>	↑ Mobilisation
<b>TM-Aufnahme</b>	<b>ZNS</b>	↑ TM-Aufnahme
<b>Verdauung</b>	<b>GIT</b>	↑ Hypertrophie des GIT
		↑ Absorptionsrate und Kapazität
		↑ Stoffwechselaktivität
<b>Herz-Kreislauf</b>	<b>HKS-System</b>	↑ Herzminutenvolumen
		↑ Anteil zum Euter
		↑ Anteil zum GIT, Leber

## 2.2. Ketose und Leberverfettung als Störungen der Adaptation an die NEB

Die Ketose und die Leberverfettung repräsentieren zwei elementare Störungen bei der Adaptation an die NEB im peripartalen Zeitraum (Goff und Horst 1997; Herdt 2000a). Die Bereitstellung der NEFA aus dem Fettgewebe und die Verwertung durch die Leber, die Milchdrüse und durch andere Organe ist zunächst ein essentieller Mechanismus der Adaptation an die NEB (Bauman und Currie 1980). Bei einem Missverhältnis zwischen dem NEFA-Angebot und der Verwertungskapazität in den Hepatocyten kommt es zur Ketogenese und zur fettigen Infiltration (Herdt 2000a; LeBlanc 2006). Beides geht einher mit einem gesteigerten Risiko für das Auftreten peripartaler Erkrankungen und Fruchtbarkeitsstörungen (Duffield 2000; Bobe et al. 2004; LeBlanc et al. 2005; Leroy et al. 2006; Wathes et al. 2007).



### **2.2.1. Ketose und Hyperketonämie**

Die Ketose ist eine metabolische Störung, welche durch erhöhte Konzentrationen der Ketonkörper BHB, Acetoacetat und Aceton gekennzeichnet ist (Ingvarsen 2006). Diese Störung tritt sowohl klinisch, als auch subklinisch in Erscheinung (Duffield 2000).

#### **2.2.1.1. Inzidenz und Risikofaktoren der Ketose**

Das Laktationsinzidenzrisiko der klinischen Ketose variiert in Untersuchungen aus Europa und den USA von 2 bis 20% (Baird 1982; Jordan und Fourdraine 1993; Kelton et al. 1998; Ingvarsen et al. 2003). Die klinische Ketose wird meist im ersten, weniger im zweiten Laktationsmonat und nur selten später in der Laktation diagnostiziert (Ingvarsen 2006).

Die Laktationsinzidenz der subklinischen Ketose ist abhängig vom Grenzwert zur Festlegung der Definition der Erkrankung (Duffield 2000). Die Empfehlungen zur Diagnostik der subklinischen Ketose reichen von 1,0mmol BHB/l bis 3,0mmol BHB/l (Geishauser et al. 1998; Duffield 2000; Duffield 2004; Oetzel 2004). Bei einem Grenzwert von 1,2mmol BHB/l hatten 59% bzw. bei einem Grenzwert von 1,4mmol BHB/l hatten 43% von 507 Milchkühen aus 25 Herden in einer kanadischen Untersuchung eine subklinische Ketose innerhalb der ersten neun Wochen p.p. (Duffield et al. 1998). Die Prävalenz der subklinischen Ketose ist in den ersten beiden Laktationswochen am höchsten (Geishauser et al. 2001).

Die wesentlichen Risikofaktoren für das Auftreten der klinischen und subklinischen Ketose sind die Parität, das Herdenmanagement, vorangegangene Erkrankungen und die Körperkondition (Grohn et al. 1989; Duffield 2000; Ingvarsen 2006).

#### **2.2.1.2. Pathophysiologie der hepatischen Ketogenese**

Die hepatische Ketogenese stellt einen physiologischen Mechanismus dar, um Glukose zu sparen (Herdt 2000a). Als Ketonkörper werden die BHB, Aceton und Acetoacetat bezeichnet. Die wasserlöslichen Ketonkörper können bei Wiederkäuern von der Niere, vom Skelettmuskel, Herz, Euter und vom Gastrointestinaltrakt zur Oxidation genutzt werden (Heitmann et al. 1987). Die Ketonkörper sind das Produkt der unvollständigen Oxidation der NEFA in den Mitochondrien der Hepatocyten im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation (Vernon 2005).

Eine Theorie zur Entwicklung der Ketose basiert auf der Verfügbarkeit von Oxalacetat (Zammit 1990). Das Oxalacetat stellt hier den limitierenden Faktor bei der Oxidation der NEFA als Verbindungsglied zum Citronensäurezyklus dar (Krebs 1966). Die Verfügbarkeit von Oxalacetat resultiert zum einen aus der Synthese hauptsächlich aus Propionat und der Verwertung im Rahmen der

Glukoneogenese als Glukose-Precursor. Die peripartale Konstellation aus sinkender Futteraufnahme mit eingeschränkter Bereitstellung von Propionat und erhöhtem Glukosebedarf für die Laktosesynthese führen zu einem relativen Mangel an Oxalacetat (Ingvarsen 2006).

Diese Theorie wird von Drackley et al. (2001) aus folgenden Gründen in Frage gestellt:

1. Das Ausmaß der  $\beta$ -Oxidation bei Wiederkäuern wird durch die Aktivität der CPT-I reguliert.
2. Oxalacetat liegt in geringen Konzentrationen im Mitochondrium vor (hohes NADH/NAD Verhältnis während der NEFA-Oxidation, welches die Ausschleusung von C-Atomen über das Malat-Shuttle begünstigt (Zammit 1990)).
3. Die  $\beta$ -Oxidation produziert Acetyl-CoA, welches die Pyruvatcarboxylase aktiviert und die Konzentration von Oxalacetat aufrechterhält.
4. Weniger die geringe Oxalacetatkonzentration, als vielmehr das hohe NADH/NAD Verhältnis verhindert die Dehydrogenase-Reaktionen im Citronensäurezyklus.
5. Geringe Konzentrationen an Succinyl-CoA in den Mitochondrien aktivieren die HMG-Co Synthase.

Normalerweise wird die Substratoxidation in der Zelle durch den Bedarf an Adenosintriphosphat (ATP) reguliert. In hoch ketotischen Zuständen der Milchkuh scheint die  $\beta$ -Oxidation unabhängig vom ATP-Bedarf der Zelle abzulaufen (Drackley und Andersen 2008). Diese Kompensation der  $\beta$ -Oxidation bei einem Überangebot der NEFA wird durch einen Anstieg der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation erklärt, welcher nicht durch die Carnitin-Palmitoyl-Transferase-I (CPT-I) reguliert wird und weniger abhängig ist vom ATP-Bedarf der Zelle (Grum et al. 1994). Die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation liefert im Vergleich zur mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation weniger ATP, da sie in keiner Verbindung zur Atmungskette steht (Drackley und Andersen 2008). Inwieweit die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation einen Anteil an der Oxidation der NEFA bei reduzierter NEFA-Verfügbarkeit hat, ist noch nicht hinreichend geklärt. Zumindest unter den Umständen, wo die mitochondriale  $\beta$ -Oxidation ausgelastet ist, scheint der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation eine bedeutendere Rolle zuzukommen, um ein Überangebot der NEFA zu verwerten (Drackley und Andersen 2008).

### 2.2.2. Leberverfettung

Die Leberverfettung ist eine metabolische Störung, welche durch einen erhöhten Gehalt an Lipiden und Triacylglyceriden (TAG) in der Leber charakterisiert ist (Goff und Horst 1997; Bobe et al. 2004). Die Leberverfettung ist typischerweise ein subklinisches Problem (Ingvarsen 2006). Klinische Symptome sind eher unspezifisch und beinhalten reduzierte Milchleistung, Futteraufnahmedepression, Apathie, reduzierte Pansenmotilität und weitere Symptome von Begleiterkrankungen (Radostits 2000). Der Leberfettgehalt allein gestattet keine Aussage, inwieweit ein pathologischer Prozess vorliegt (Staufenbiel 1990). Eine Leberverfettung ist sogar mit höherer Milchfettleistung korreliert und muss

als Adaptationsvermögen an die negative Energiebilanz verstanden werden (Staufenbiel et al. 1990). Erhöhte Leberfettgehalte gehen aber mit einem größeren Risiko für Fruchtbarkeitsprobleme und Gesundheitsstörungen einher (Jorritsma et al. 2000; Bobe et al. 2004).

### **2.2.2.1. Inzidenz und Risikofaktoren für die Leberverfettung**

Die postpartal auftretende fettige Infiltration der Leber erreicht ihr Maximum 1 bis 2 Wochen p.p. (Staufenbiel 1989; Johannsen 1991) und bildet sich bis zur achten Woche p.p. in der Regel wieder zurück (Johannsen 1991). Johannsen (1991) konnte ante partum und jenseits der achten Wochen post partum keine Leberverfettung nachweisen. Ein Leberfettgehalt zwischen 3-6% wird in dieser Zeit als physiologisch angesehen (Fürl 1989). Im Gegensatz dazu kann man nach Meinung anderer Autoren einen erhöhten Leberfettgehalt auch schon ante partum messen (Vazquez-Anon et al. 1994; Bobe et al. 2004).

Die Inzidenz der subklinischen (moderaten) Leberverfettung (5-10% TAG in der Leber-Feuchtsubstanz) in der Frühlaktation kann bis zu 50% betragen (Reid 1980; Jorritsma et al. 2001). Die Inzidenz der schweren Leberverfettung (>10% TAG in der Leber-Feuchtsubstanz) in der Frühlaktation liegt zwischen 5-15% (Reid 1980; Jorritsma et al. 2001). In einer anderen Untersuchung hatten von 979 Tieren 22,2% einen Leberfettgehalt > 12% in der ersten Woche p.p. und von 814 Tieren hatten 14,2% einen Leberfettgehalt > 12% in der dritten bis fünften Woche p.p. (Roemer 2005).

Die Risikofaktoren für eine Leberverfettung sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Ein wesentlicher Risikofaktor für die Entstehung der Leberverfettung ist eine Überkonditionierung vor der Kalbung (Herdt 2000a). Antepartal überkonditionierte Tiere haben im Vergleich zu normal-konditionierten Tieren eine ausgeprägtere Futteraufnahmedepression und Fettmobilisation, welche aus einer geringeren Sensitivität gegenüber lipogenetischen Signalen und einer erhöhten Sensitivität gegenüber lipolytischen Signalen resultiert (Grummer 1993; Rukkwamsuk et al. 1998; Herdt 2000a). Weiterhin besteht ein Zusammenhang zwischen der Leberverfettung und dem Auftreten weiterer metabolischer (Veenhuizen et al. 1991; Rehage et al. 1996) und infektiöser Erkrankungen (Suriyasathaporn et al. 2000; Zerbe et al. 2000; Lacetera et al. 2005). Hier sind insbesondere die Labmagenverlagerung (**LMV**) und die Ketose hervorzuheben.

Tabelle 2: Risikofaktoren für eine Leberverfettung bei Milchkühen

Risikofaktor	Effekt <sup>1</sup>	Autor
<b>Ante Partum</b>		
Überkonditionierung (BCS>4,0)	++	Wensing et al., 1997
Futterrestriktion	+++	Gerloff und Herdt, 1984
Energiebetonte Ration	++	Wensing et al., 1997
lange ZKZ	+	Stöber und Scholz, 1991
<b>Post Partum</b>		
Krankheiten und Infektion	++	Katoh, 2002
Nahrungskarenz	+++	Brumby et al., 1975; Fürll et al., 1993
Futterrestriktion	++	Staufenbiel et al., 1992; Drackley, 1999
Ketogene Futtermittel	+	Stöber und Scholz, 1991
plötzliche Futterwechsel	+	Stöber und Scholz, 1991, Gerloff, 2000

<sup>1</sup> + geringfügiger; ++ moderater; +++ starker Risikofaktor

### 2.2.2.2. Pathophysiologie der Leberverfettung

Die Fettakkumulation in den Hepatocyten im peripartalen Zeitraum ist die Folge der inadäquaten Verwertung der NEFA. Die Aufnahme der NEFA in die Hepatocyten ist abhängig von der Konzentration im Blut (Drackley et al. 2001). Dabei nimmt die Leber ungefähr 30% des NEFA-Gesamtgehaltes im Blut auf (Emery et al. 1992). Die aus der Peripherie anflutenden NEFA werden Carrier-vermittelt in das Cytosol der Hepatocyten aufgenommen. Dort wird mittels einer Thiokinase das Acyl-CoA als aktivierte Form der Fettsäure gebildet. In der Leber können die Fettsäuren entweder vollständig zu CO<sub>2</sub> oder unvollständig zu Ketonkörpern oxidiert werden bzw. sie können auch zu TAG oder Phospholipiden verestert werden (Abb. 2) (Zammit 1990; Vernon 2005). Vorrangig werden sie zur Energiegewinnung im Rahmen der  $\beta$ -Oxidation genutzt (Drackley et al. 2001).

Inwieweit die NEFA oxidiert oder verestert werden hängt von der Aktivität der Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase (GPAT) und der CPT-I ab. Die GPAT katalysiert den initialen Schritt zur NEFA-Veresterung, wohingegen die CPT-I an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert ist und die Umwandlung der aktivierten Form der NEFA in die entsprechenden Acyl-Carnitinderivate katalysiert (Vernon 2005). Die Aktivität der CPT-I in der Leber ist gegenüber der Aktivität 21d a.p. am 1d p.p. 49% und am 21d p.p. 27% größer gewesen (Dann et al. 2000). Die Sensitivität der CPT-I gegenüber Malonyl-CoA ist hingegen unverändert im peripartalen Zeitraum (Dann und Drackley 2005). Die Aktivität der CPT-I ist im Wesentlichen abhängig von der Verfügbarkeit von Propionat und Acetat (Vernon 2005). Bei ausreichender Futteraufnahme wird die Leber mit substantiellen Mengen von Acetat und Propionat aus der Pansenfermentation versorgt und die Aktivität der CPT-I wird über entsprechende Mediatoren (Malonyl-CoA und Methylmalonyl-CoA) gehemmt, so dass die NEFA eher zur Lipidsynthese als zur Oxidation genutzt werden (Zammit 1990). In diesem Zustand wird ebenfalls durch den lipogenetischen Effekt von Insulin die Menge an NEFA aus der Lipolyse begrenzt (Herdt 2000a). Bei unzureichender Futteraufnahme steht der Leber weniger Propionat und Acetat zur

Verfügung. Dementsprechend speist sich die Glukoneogenese weniger aus Propionat und die entsprechende Hemmung auf die CPT-1 durch das Methylmalonyl-CoA entfällt, genauso wie der hemmende Einfluss des Malonyl-CoA (Zammit 1990). Die Mobilisierung von Körperfett liefert unter dem fehlenden Einfluss von Insulin in diesem Zustand eine entsprechende Substratmenge der NEFA zur Oxidation (Herdt 2000a).

Im Gegensatz zu Monogastriern ist die de novo TAG-Synthese in der Leber der Wiederkäuer wenig ausgeprägt (Zammit 1990). Die Fähigkeit zur Veresterung von NEFA zu TAG steigt gleichgerichtet mit dem Gehalt an mRNA für die GPAT vom antepartalen zum postpartalen Zeitraum an (Drackley und Andersen 2008). Die TAG können in der Leberzelle gespeichert oder als Lipoproteine (VLDL) ausgeschleust werden. Die Fähigkeit der Wiederkäuer zur Sekretion von very-low-density-lipoproteins (VLDL) ist im Vergleich zu anderen Spezies nur eingeschränkt (Pullen et al. 1990).

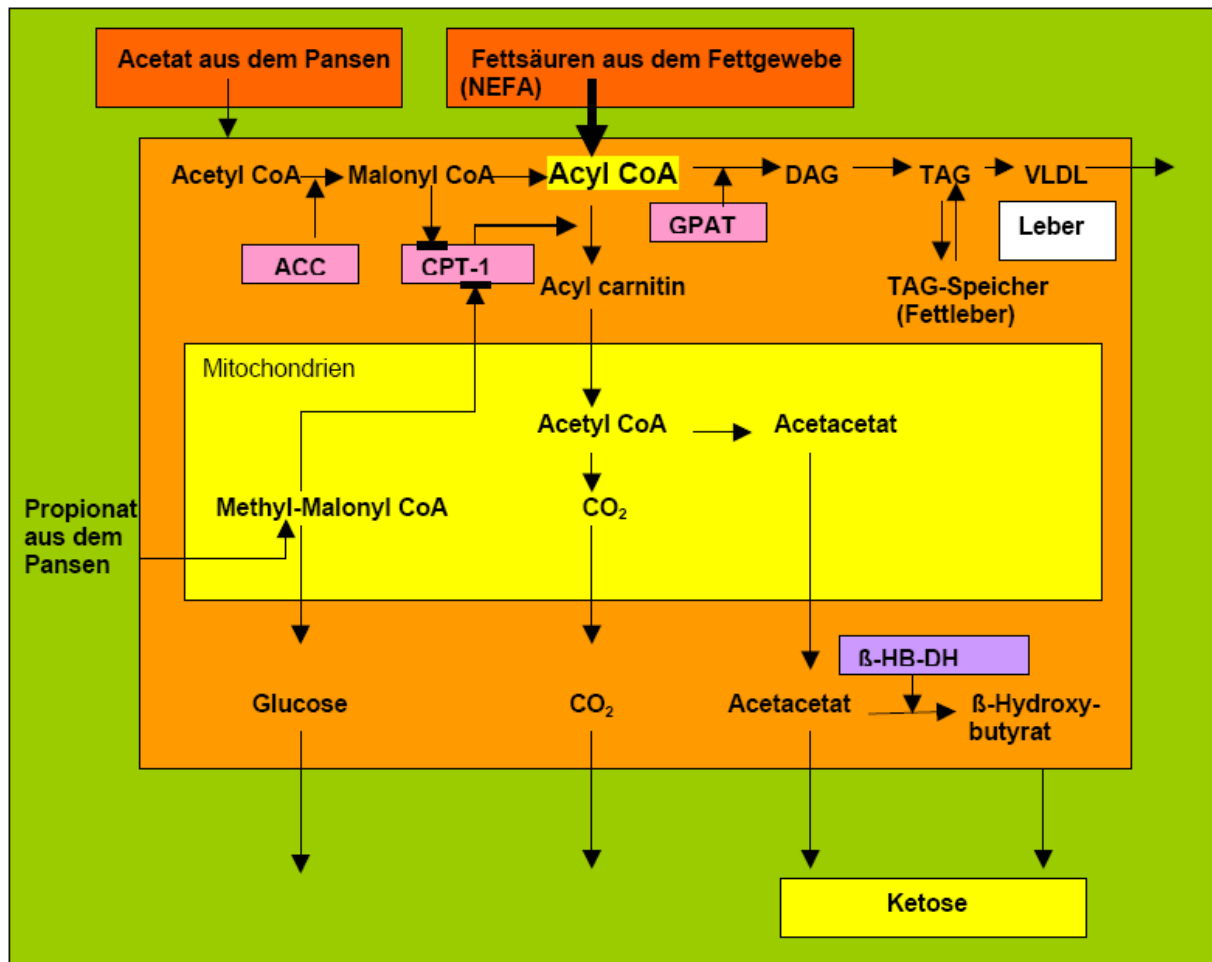


Abbildung 2: Schematischer NEFA-Stoffwechsel in der Leber (mod. nach Vernon 2005)

ACC = Acetyl-CoA-Carboxylase; CPT-1 = Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1; GPAT = Glycerol-3-Phosphat-Acyltransferase; DAG = Diacylglycerol, TAG = Triacylglycerol, VLDL = Very Low Density Lipoproteins,  $\beta$ -HB-DH =  $\beta$ -Hydroxybutyrat-Dehydrogenase

Eine moderate fettige Infiltration der Hepatocyten zur Kalbung ist primär ohne pathologische Bedeutung und reversibel (Ingvarsen 2006). Dennoch geht die histologische und strukturelle Veränderung der Hepatocyten im Rahmen der Leberverfettung mit Veränderungen des Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsels auf zellulärer Ebene einher (Bobe et al. 2004). Übersteigt das Verhältnis von Fett zu Glykogen in der Leber 2:1, dann geht dies einher mit verminderter Glukoneogenese und Harnstoffsynthese sowie erhöhter Ketogenese (Grummer 1993; Drackley et al. 2001). Dabei scheint die Fettakkumulation im Hepatocyten keinen direkten Einfluss auf die Glukoneogenese zu haben (Strang et al. 1998). Vielmehr geht die Fettakkumulation in den bovinen Hepatocyten mit einer verminderten Harnstoffsynthese einher, welche möglicherweise einen indirekten Einfluss auf die Glukoneogenese hat (Strang et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass Ammoniak die Glukoneogenese aus Propionat negativ beeinflusst (Overton et al. 1999). Die Enzymaktivitäten der meisten glukoneogenetischen Enzyme waren ante partum (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, Pyruvat-Carboxylase und Propionyl-CoA-Carboxylase,  $p < 0,05$ ; Fruktose-1,6-Bisphosphatase und Glucose-6-Phosphatase,  $p < 0,1$ ) und zum Teil post partum (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Propionyl-CoA-Carboxylase,  $p < 0,05$ ) bei Tieren mit induzierter Leberverfettung erniedrigt (Murondoti et al. 2004). Die Enzymexpression wesentlicher glukoneogenetischer Enzyme in der Frühaktation (Glukose-6-Phosphatase und Pyruvat-Carboxylase) unterschied sich ebenfalls zwischen Tieren mit spontan erhöhtem Leberfettgehalt und Tieren mit geringem Leberfettgehalt (Hammon et al. 2009).

### **2.3. Pathophysiologische Wirkung der NEFA**

Die pathophysiologische Bedeutung der NEFA muss differenziert betrachtet werden. Die negativen Effekte der NEFA stehen primär in engem Zusammenhang mit der Maladaptation an die NEB. Diese sind anerkannt und gut beschrieben (Goff und Horst 1997; Herdt 2000a; Jorritsma et al. 2003; Ingvarsen 2006).

Daneben scheint es direkte toxische Effekte der NEFA zu geben, welche Gegenstand aktueller Diskussion sind (Jorritsma et al. 2004; Leroy et al. 2005b; Vanholder et al. 2005; Scalia et al. 2006; Vanholder et al. 2006b). Die Trennung zwischen diesen beiden Phänomenen ist aber nicht sinnvoll, da sie gemeinsam auftreten und die toxischen Effekte als mögliche Erklärungsgrundlage zum besseren Verständnis der Gesundheitsstörungen im Zusammenhang mit der Maladaptation an die NEB beitragen.

Die beim Rind beschriebenen toxischen Effekte der NEFA beschränken sich bisher auf die Fruchtbarkeit, die biologische Wirkung von Insulin und auf das Immunsystem.

### 2.3.1. Pathophysiologischer Einfluss der NEFA auf die Fruchtbarkeit

Die Fruchtbarkeitsleistung der Milchkühe hat sich in den letzten Jahrzehnten weltweit verschlechtert (Lucy 2001). In den USA sank der Erstbesamungserfolg über 20 Jahre hinweg um 0,45 % pro Jahr (Butler und Smith 1989), in England um 1 % pro Jahr auf 40 % (Royal et al. 2000). In den Niederlanden verringerte sich der Erstbesamungserfolg innerhalb von 10 Jahren von 55,5 % auf 45,5 % (Jorritsma et al. 2000).

Die Hauptprobleme der Subfertilität der modernen Milchkuh sind die zystischen Ovarerkrankungen (Lucy 2001), verzögerte Brunst und Ovulation (Butler 2003), verminderte Brunsterscheinungen (Lopez et al. 2004), geringe Konzeptionsraten (Beam und Butler 1999; Lucy 2001) und eine reduzierte Oocyten- und Embryoqualität (Leroy et al. 2005a). Die Ursachen für Fruchtbarkeitsstörungen sind selten monokausal, sondern vielmehr multifaktorieller Natur (Leroy et al. 2006).

Die Qualität der intrafollikulären Umweltbedingungen, in denen die präovulatorische Eizelle wächst und reift, sind essentiell für die spätere Fruchtbarkeit (Leroy et al. 2004). Die wachsende und sich entwickelnde Eizelle ist in der Follikelflüssigkeit von dominanten Follikeln den typischen biochemischen Veränderungen (NEFA, BHB, Glukose, Harnstoff) ausgesetzt ist, welche bei Hochleistungskühen unmittelbar p.p. erscheinen (Comin et al. 2002; Jorritsma et al. 2003a; Leroy 2006).

Die Palmitinsäure (C16:0), die Stearinsäure (C18:0) und die Ölsäure (C18:1) sind die dominierenden Fettsäuren in der NEFA-Fraktion des Serums und der Follikelflüssigkeit (Leroy et al. 2005b). In der Früh-laktation ist die Konzentration der NEFA in der Follikelflüssigkeit (Abb. 3) von dominanten Follikeln geringer als im Serum (Leroy et al. 2004).

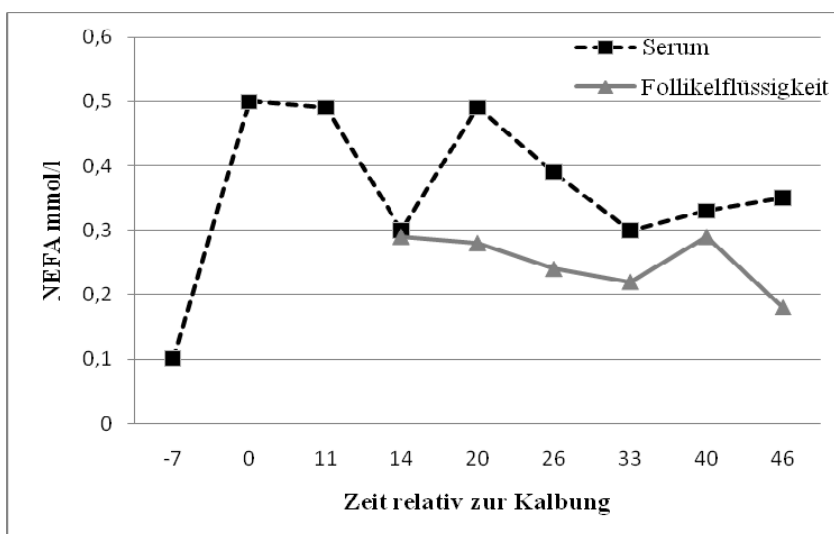


Abbildung 3: NEFA-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit von dominanten Follikeln (mod. nach Leroy et al. 2004)

Als mögliche Ursachen für die niedrigeren Konzentrationen der NEFA in der Follikelflüssigkeit wird der Einfluss der Follikel-Blutbarriere, der um 7% erniedrigte Albumingehalt in der Follikelflüssigkeit, die Abwesenheit von Low-Density-Lipoproteinen in der Follikelflüssigkeit (transportieren die gesättigten Fettsäuren) und eine Metabolisierung der NEFA durch intrafollikuläre Zellen diskutiert (Leroy et al. 2005b).

In vitro konnte ein negativer Effekt der NEFA auf die Entwicklungsfähigkeit von bovinen Oocyten und die Funktion von bovinen Granulosa- und Thekazellen nachgewiesen werden (Jorritsma et al. 2004; Leroy et al. 2005b; Vanholder et al. 2005; Vanholder et al. 2006b). Die Oocyten zeigten nach der Inkubation mit den NEFA reduzierte Befruchtungs- und Teilungsraten (Leroy et al. 2005b). Die Granulosa- und die Thekazellen zeigten während der Inkubation vermehrte Apoptosen und reduzierte Zellproliferation (Vanholder et al. 2005; Vanholder et al. 2006b). Der zelluläre Mechanismus, der dem zu Grunde liegt, ist noch nicht bekannt. Bei humanen Granulosazellen wurde die Apoptoseinduktion durch Fettsäuren auf die Bildung von Acyl-CoA und somit zu einer vermehrten Expression von Bax (Apoptose-Stimulation) und einer reduzierten Expression von Bcl-2 (Apoptose-Inhibition) zurückgeführt (Mu et al. 2001). Diskutiert werden auch Veränderungen der Membraneigenschaften (Vanholder et al. 2005). Die Fähigkeit der NEFA, Zellmembranen zu penetrieren, ist abhängig von der Sättigung und der Position der Doppelbindung(en). Gesättigte Fettsäuren erhöhen und ungesättigte vermindern die Membranstabilität (MacDonald und MacDonald 1988).

Britt (1992) stellte die Hypothese auf, dass Follikel, die in der Phase der NEB peripartal heranwachsen, von diesen ungünstigen metabolischen Veränderungen beeinflusst werden und später zu einer funktionell inkompetenten Oocyte werden.

Welchen Einfluss die NEFA auf die bovine Follikel- und Oocytenentwicklung haben, lässt sich aus den in vitro Versuchen nur vermuten, aber es kann mit großer Sicherheit festgestellt werden, dass die Konzentration der NEFA in der Umgebung der wachsenden und sich entwickelnden Eizelle eine vergleichbare peripartale Dynamik aufweist, wie sie im Blut zu finden ist (Leroy et al. 2006). Die Ergebnisse der in vitro Versuche geben Hinweise für ausgeprägtere Einflüsse der gesättigten Fettsäuren mit einer negativen Konsequenz für die spätere Fruchtbarkeit der Eizellen (Tab. 3).



Tabelle 3: Pathogenetische Wirkung der NEFA auf Zellen des Reproduktionstraktes des Rindes

Autor	Zellen	NEFA <sup>1</sup>	pathogenetische Wirkung
Shehab-El-Deen et al. 2009	Blastocysten	0,133 mmol/l PS 0,067 mmol/l SS	reduzierte Cryotoleranz
Vanholder et al. 2006	Thekazellen	0,2 mmol/l PS M1 M2	Apoptoseinduktion reduzierte Zellproliferation reduzierte P4-produktion (M2)
Vanholder et al. 2005	Granulosazellen	0,15 mmol/l PS 0,15 mmol/l SS 0,5 mmol/l OS M3	Apoptoseinduktion reduzierte Zellproliferation Stimulation der E2-produktion
Jorritsma et al. 2004	Granulosazellen	1,0 mmol/l OS	reduzierte Proliferation
Leroy et al. 2005	Oocyten	0,133 mmol/l PS 0,067 mmol/l SS	Apoptoseinduktion negativer Einfluss auf die Fertilisationsrate, die Teilungsrate, die Blastocystenformation
Jorritsma et al. 2004	Kumulus-Oocyten	1,0 mmol/l OS	verzögerte Reifung

<sup>1</sup> PS – Palmitinsäure (C16:0); SS – Stearinsäure (C18:0); OS – Ölsäure (C18:1); M1 – 0,1mmol PS, 0,13mmol SS, 0,14mmol OS; M2 – 0,2mmol PS, 0,26mmol SS, 0,28mmol OS; M3 – je 0,15mmol PS, SS, OS

### 2.3.2. Pathophysiologischer Einfluss der NEFA auf die biologische Wirkung von Insulin

Die physiologische Wirkung von Insulin ist in der Transitperiode von besonderem Interesse, da dem Insulin eine Beteiligung in der Konkurrenzbeziehung zwischen Leistung, metabolischen Störungen und Fruchtbarkeit zukommt.

Im biologischen Sinne scheint die Insulinresistenz, vor allem vermittelt durch das Wachstumshormon, in der Früh-laktation sinnvoll, da die Reduktion der Glukoseaufnahme durch extramammäre Gewebe der Konservierung der Glukose für die Milchsynthese durch insulin-unabhängige Glukosetransporter dient (Chagas et al. 2007). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise für den Zusammenhang zwischen gestörter Insulinwirkung und Störungen im Bereich der Fruchtbarkeit und des Stoffwechsels (Oikawa und Oetzel 2006; Vanholder et al. 2006a; Bossaert et al. 2008).

In einem Experiment an 6 nicht-tragenden und nicht-laktierenden Holstein-Kühen wurde durch eine „Talg-Infusion“ eine künstliche NEFA-Erhöhung simuliert (3,7facher Anstieg auf 0,295mmol/l im Vergleich zur Kontrollgruppe) (Pires et al. 2007). Anschließend konnte in einem intravenösen Glukose Toleranztest eine verminderte Glukoseclearance nachgewiesen werden. Trotz erhöhter Insulinkonzentrationen konnte die Glukosekonzentration nicht verringert werden. Dies deutet auf eine Insulinresistenz der peripheren Gewebe hin (Reduktion des Insulin-Sensitivitätsindex um 84,6%). Bei anschließender Insulinbelastung wurde dies bestätigt durch eine gestörte Ansprechbarkeit für Insulin.

Inwieweit diese Ergebnisse übertragbar auf die peripartale Stoffwechselsituation der Milchkuh sind, kann nur vermutet werden, denn neben der NEFA-Erhöhungen durch die Lipidemulsion kam es auch zu einer unphysiologischen Erhöhung der Triglyzeride (41mg/dl). Allerdings sind bei Kühen bei weitem höhere NEFA-Werte um den Partus bekannt, als in diesem Experiment induziert.

In einer vergleichenden Untersuchung an gesunden Tieren, Tieren mit Fettleber und Tieren mit Fettleber und Ketose in der zweiten und dritten Laktationswoche zeigten die kranken Tiere in einem hyperinsulinämischen euglykämischen Clamp-Test eine ausgeprägte Insulinresistenz (Kräft 2004). Die maximale biologische Antwort des Insulins bei den Tieren mit Leberverfettung und Ketose war gegenüber den gesunden Tieren um 60% reduziert. Die Autorin postuliert einen möglichen Einfluss der NEFA auf die biologische Wirkung von Insulin.

Die NEFA-induzierte Insulinresistenz liefert einen möglichen ätiopathogenetischen Erklärungsansatz, warum gerade überkondionierte Tiere auf das peripartale Energiedefizit mit übermäßiger Lipolyse reagieren und begründet womöglich das erhöhte Risiko für das Auftreten von Reproduktionsstörungen und peripartalen Erkrankungen bei diesen Tieren.

Im Pankreas von Ratten ist nachgewiesen, dass NEFA die Insulin-Sekretion reduzieren (Mason et al. 1999). In verschiedenen in vitro Versuchen konnten zytotoxische Effekte der NEFA an  $\beta$ -Zellen des Pankreas von Ratten nachgewiesen werden (Tab. 4). Der Pathomechanismus beruhte hier auf der Apoptoseinduktion durch die Bildung von Ceramiden (Shimabukuro et al. 1998; Cnop et al. 2001; Maedler et al. 2001).

Tabelle 4: Pathogenetische Wirkung der NEFA auf  $\beta$ -Zellen der Ratte

Autor	NEFA <sup>1</sup>	pathogenetische Wirkung der NEFA
Cnop et al. 2001	OS, PS	Apoptose; Ceramid-Produktion; Fettakkumulation
Maedler et al. 2001	0,5mmol/l PS	Apoptose; Ceramid-Produktion; NO-Produktion
Shimabukuro et al. 1998	1,0mmol/l OS PS	Apoptose; Ceramid-Produktion

<sup>1</sup> PS – Palmitinsäure (C16:0) ; SS – Stearinsäure (C18 :0) ; OS – Ölsäure (C18:1)

### 2.3.3. Pathophysiologischer Einfluss der NEFA auf das Immunsystem

Die Anfälligkeit für Infektionserkrankungen im peripartalen Zeitraum ist Ausdruck einer gestörten Immunkompetenz bzw. einer Immunsuppression (Goff und Horst 1997). Insbesondere die Entwicklung von klinischen und subklinischen Euter- und Gebärmutterentzündungen in der Früh-laktation wird in Verbindung gebracht mit der eingeschränkten humoralen und zellulären Immunkompetenz und der Maladaptation an die NEB (Suriyasathaporn et al. 2000; Hammon et al. 2006; Nyman et al. 2008; Moyes et al. 2009).

In einer in vitro Studie an PMN wurden bei einer Kultivierung mit NEFA in einer Konzentration von 2,0mmol/l verschiedene Effekte nachgewiesen (Scalia et al. 2006). Die NEFA führten zu einer vermehrten Anzahl an Nekrosen, einer reduzierten Lebensfähigkeit und einem erhöhtem oxidativen

Burst. Die Phagozytosefähigkeit der polymorphkernigen Granulozyten (**PMN**) war hierbei nicht eingeschränkt. Eine weitere in vitro Studie konnte zeigen, dass bei Inkubation von Lymphozyten mit NEFA (30% aus PS, 5% Palmitoleinsäure, 15% SS, 45% OS und 5% Linolsäure) diese eine verminderte Synthese von IFN- $\gamma$ , IgM und DNA aufwiesen (Lacetera et al. 2004).

Diese in vitro Ergebnisse werden durch verschiedene Beobachtungen in vivo unterstützt. Im Vergleich zu antepartal unter- ( $BCS < 2,5$ ) oder normal-konditionierten ( $2,5 \leq BCS \leq 3,5$ ) Kühen wiesen die mononukleären Zellen von überkonditionierten Tieren ( $BCS > 3,5$ ) 14 und 35d p.p. eine geringere IgM-Synthese-Kapazität und 7d a.p. eine geringere IFN- $\gamma$ -Produktion auf (Lacetera et al. 2005). Beim Vergleich von Kühen mit puerperaler Metritis oder subklinischer Endometritis mit Tieren ohne Störung der Gebärmuttergesundheit in der Frühlaktation hatten die gesunden Tiere die PMN mit der größeren Myeloperoxidaseaktivität (Hammon et al. 2006). Die Myeloperoxidaseaktivität der PMN war negativ mit der NEFA-Konzentration korreliert ( $r = -0,44$ ,  $p < 0,05$ ).

Die uneingeschränkte Funktion der PMN ist eine grundlegende Voraussetzung für die Funktionalität der Abwehrmechanismen des Euters (Suriyasathaporn et al. 2000). Kühe, die in der ersten Woche p.p. an einer klinischen oder subklinischen Mastitis erkrankten, wiesen schon im antepartalen Zeitraum erhöhte NEFA-Konzentrationen auf (Moyes et al. 2009). In der gleichen Untersuchung hatten die Kühe, die in der Frühlaktation ( $> 2$  Wochen p.p.) an einer klinischen Mastitis erkrankten, zwei Wochen vor der Diagnose ebenfalls erhöhte NEFA-Konzentrationen im Vergleich zu den gesunden Tieren im selben Zeitraum.

Die in vitro und in vivo Untersuchungen liefern Hinweise, dass es einen negativen Zusammenhang zwischen der Konzentrationen der NEFA und der eingeschränkten Immunkompetenz im peripartalen Zeitraum gibt (Tab. 5).

Tabelle 5: Pathogenetische Wirkung der NEFA auf PMN und Lymphozyten des Rindes

<b>Autor</b>	<b>Zellen</b>	<b>NEFA</b>	<b>pathogenetische Wirkung der NEFA</b>
Scalia et al. 2006	PMN	2,0 mmol/l	reduzierte Lebensfähigkeit erhöhter oxidativer Burst erhöhte Anzahl an Nekrosen
Lacetera et al. 2004	Lymphozyten	0,5 mmol/l 0,25 mmol/l 0,125 mmol/l	reduzierte DNA-Synthese reduzierte IgM-Synthese reduzierte IFN- $\gamma$ -Synthese

## 2.4. Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels

### 2.4.1. Ausgewählte Parameter zur Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels

Das Ausmaß der negativen Energiebilanz und die Fähigkeit der Adaptation an diese haben großen Einfluss auf die Gesundheit und die Produktivität (Herdt 2000a; Reist et al. 2002; Van Saun 2007b).

Die Objektivierung der energetischen Veränderungen im Laktationszyklus, insbesondere der zeitlichen und quantitativen Ausdehnung der Phase der negativen Energiebilanz und deren Adaptation ist vor diesem Hintergrund von großer Bedeutung (Reist et al. 2002).

Die Adaptation ist ein gradueller Prozess, der sich zwischen den Tieren unterscheidet. Eine rigide Einteilung in eine zeitgerechte und verzögerte bzw. erfolgreiche und misslungene Adaptation zu einem Zeitpunkt ist nicht sinnvoll, da auf lange Sicht die Mehrzahl der Kühe die Adaptation bewältigt (Jorritsma et al. 2003). Vielmehr ist es sinnvoll die Qualität der Adaptation und das Risiko für die fehlgeschlagene Adaptation einzuschätzen (Abb. 4).

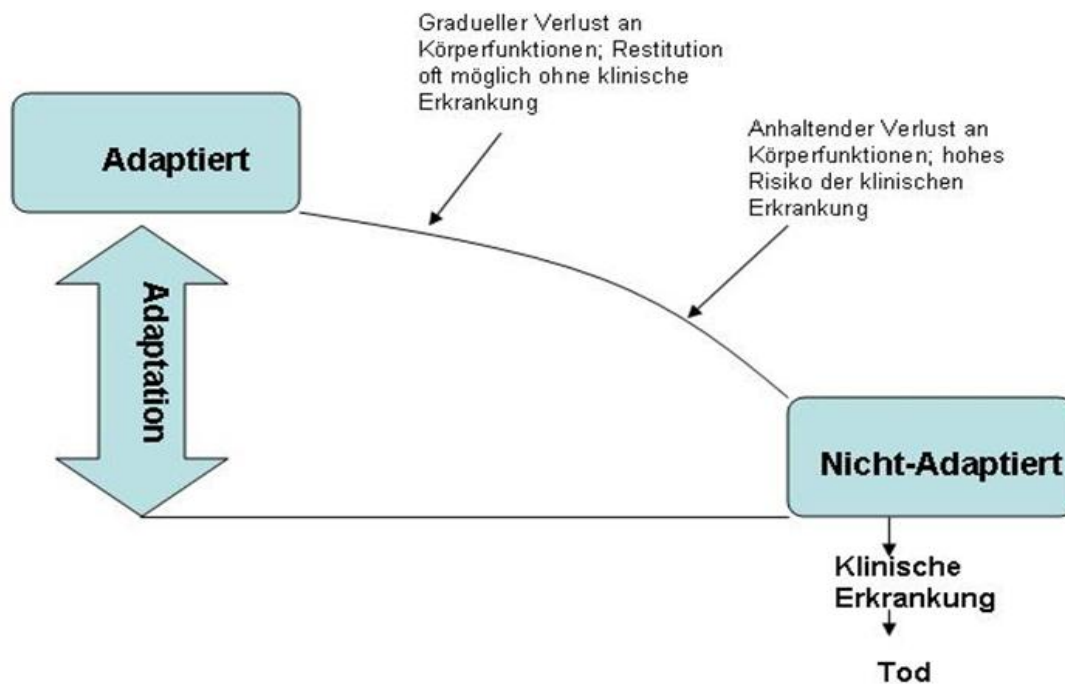


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Adaptation (mod. nach Jorritsma et al. 2003)

Zur Risikoeinschätzung können verschiedene Parameter herangezogen werden: die kalkulierte negative Energiebilanz, die Futteraufnahme, die Milchleistung, die Entwicklung der Körperkondition, die Milchinhaltsstoffe und verschiedene metabolische Parameter (Jorritsma et al. 2003).

Unter den metabolischen Parametern dienen unter anderem die folgenden als Indikatoren für das Risiko zur fehlgeschlagenen Adaptation an die NEB: erhöhte Konzentrationen der NEFA (Bell 1995; Herdt 1997; Jorritsma et al. 2003; Hachenberg et al. 2007; Duffield et al. 2009), erhöhte Konzentrationen von BHB (Bell 1995; Oetzel 2004; Duffield und LeBlanc 2006; Duffield et al. 2009), verminderte Glukosekonzentrationen (Grum et al. 1996), erniedrigte Werte von Insulin und IGF-1 (Butler et al. 2003), reduzierte Plasmaleptinkonzentrationen (Block et al. 2001) und erhöhte Leberfettgehalte (Bertics et al. 1992; Grummer 1993; Jorritsma et al. 2003; Rossow 2003).

Bislang gibt es keinen einzelnen Risikoparameter, der zu einem Zeitpunkt eine adäquate Information über den Grad der Adaptation liefert. Auf Grund der Komplexität ist es unwahrscheinlich, dass dieser jemals gefunden wird (Jorritsma et al. 2003). Vielmehr hat sich die Kombination von verschiedenen

Parametern, im Sinne eines metabolischen Profils, zur Überwachung der Stoffwechselfundheit von Milchviehherden geeignet (Oetzel 2004; Duffield und LeBlanc 2006; van Saun 2007a). Bei der Bewertung des Energiestoffwechsels haben die NEFA und die BHB eine zentrale Bedeutung (Reist et al. 2002; Duffield 2004).

#### 2.4.2. Präanalytische Einflüsse bei der Bestimmung der NEFA und der BHB

Prinzipiell können die Ergebnisse von Blutuntersuchungen durch eine unsachgemäße Entnahme und im Rahmen der weiteren Behandlung derart verfälscht werden, dass eine diagnostische Verwertung der Ergebnisse nicht mehr möglich ist oder es zu Fehlinterpretationen kommen kann (Gelfert und Staufenbiel 1998). Die möglichen Fehlerquellen in der klinisch-chemischen Diagnostik sind vielfältig und in Tabelle 6 zusammengefasst. Daher sind präanalytische Anforderungen und Standardisierungen eines Tests notwendig, um aussagekräftige Informationen in der Diagnostik zu erhalten. Unter dem Begriff Präanalytik werden alle Prozesse zusammengefasst, die vor der eigentlichen Laboranalyse ablaufen.

Bei der Anwendung der NEFA und der BHB sind insbesondere die postprandiale bzw. diurnale Dynamik der Parameter, die Probenentnahme, die Probenbehandlung und die Probenlagerung von besonderer Bedeutung.

Tabelle 6: Fehlerquellen in der klinisch-chemischen Diagnostik (Rossow et al. 1987)

<b>zufällige Fehler</b>	<b>Systematische Fehler</b>	<b>Präanalytische Einflussgrößen</b>
- Inhomogenität der Blutprobe	- Ungenaue Justierung von Geräten oder Pipetten	- Nichtbeachtung der postprandialen Dynamik
- Ungenauigkeit von Pipetten	- Küvettenfehler	- Nichtbeachtung der Biorhythmik
- Nichteinhaltung bestimmter Temperaturen	- Falsche Bezugs- oder Kalibrationskurve	- zu lange Blutstauung (> 30s)
- Ungenaueres Ablesen	- Ungenaue Methode	- Verwendung zu englumiger Kanülen
- Ermüdungsfehler	- Verwechslung von Proben bei Analyseautomatenbeschickung	- Verwendung von hämolytischem Blut
- Berechnungsfehler		- zu starke Erregung des Patienten
		- Probenverwechslung
		- Fehlerhafter Probentransport
		- Fehlerhafte Probenlagerung
		- Verschmutzte Abnahmegefäße

### 2.4.2.1. Diurnale Dynamik der NEFA und der BHB

Die tageszeitliche Variation im Fressverhalten führt zu Veränderungen des Pansenmilieus und diurnalen Rhythmen verschiedener Blutinhaltsstoffe (Sutton et al. 1988; Blum et al. 2000; Keunen et al. 2002). Dies betrifft auch die Konzentration der NEFA und der BHB im peripheren Blut (Nielsen et al. 2003; Plaizier et al. 2005; Ametaj et al. 2009). Das Ausmaß der tageszeitlichen Variation wird im Wesentlichen durch das Fütterungsmanagement beeinflusst (Blum et al. 2000). Je diskontinuierlicher die Futtevorlage und die Aufnahme von Konzentratfutter, desto ausgeprägter ist auch die tageszeitliche Variation (Sutton et al. 1988). Die Verwendung einer TMR-Fütterung reduziert zwar die Variation in der Nährstoffresorption durch eine gleichwertige Nährstoffaufnahme, dennoch existiert eine ausgeprägte Diskontinuität in der Intensität des Fressverhaltens über den Tag (DeVries et al. 2003; Nikkhah et al. 2008; Zebeli et al. 2008). Das Fressverhalten wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Hierzu zählen u.a. die Belegungsdichte, die Melkfrequenz, die Frequenz der Futtevorlage, die Rationszusammensetzung, der soziale Rang des einzelnen Tieres und das Stallbaudesign (DeVries et al. 2004; DeVries und von Keyserlingk 2005; DeVries und von Keyserlingk 2006; Huzzey et al. 2006; Zebeli et al. 2008). Das Fressverhalten und dementsprechend auch die Ausprägung der tageszeitlichen Variation der NEFA und der BHB sind somit für das Einzeltier individuell und auf Herdenebene gruppenspezifisch.

Vom Grundsatz her lassen sich für die NEFA und die BHB folgende zwei Reaktionsmuster unterscheiden (Abb. 5): die NEFA zeigen die höchste Konzentration unmittelbar vor der ersten Futtevorlage und die BHB für gewöhnlich danach (Drackley 2000; Nielsen et al. 2003; Oetzel 2004; Odensten et al. 2005; Plaizier et al. 2005; Nikkhah et al. 2008; Wylie et al. 2008; Ametaj et al. 2009). Die erhöhte Konzentration der NEFA vor der ersten Futtevorlage wird durch die geringe Futteraufnahme in der Nacht erklärt (Nielsen et al. 2003). Das starke Absinken nach der ersten Futtevorlage ist das Resultat der ausgeprägten Insulinausschüttung und der Begrenzung der Lipolyse (Herdt 2000a). Die Insulinausschüttung wird vor allem durch die Resorption von Propionat aus dem Pansen stimuliert (Bradford et al. 2006).

Im Gegensatz dazu unterliegt der BHB-Gehalt im Blut dem Einfluss der Verwertung der Ketonkörper und dem Zufluss aus der ruminogenen und hepatogenen Ketogenese (Ingvarsen 2006). Für die Ausprägung der Tagesdynamik der BHB im Zusammenhang mit der Fütterung ist hier die ruminogene Ketogenese von Bedeutung. Die Aktivität der ruminogenen Ketogenese ist abhängig von der Substratmenge (Fressverhalten) und der Pansenfermentation (Rationszusammensetzung). Der Anteil an leichtverdaulichen Kohlenhydraten hat hier einen großen Einfluss auf die Ausprägung der diurnalen Dynamik der BHB (Nielsen et al. 2003; Nikkhah et al. 2008; Ametaj et al. 2009).

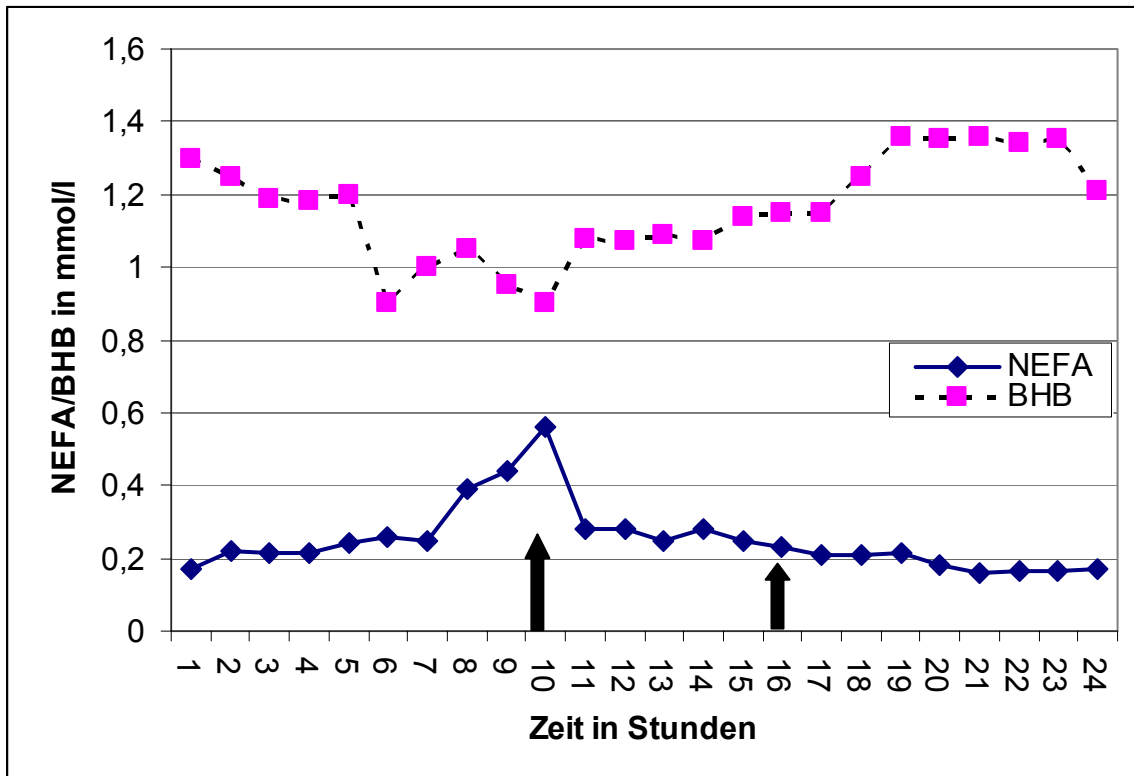


Abbildung 5: Tagesprofil der NEFA und der BHB im Serum von Milchkühen bei zweimaliger TMR-Fütterung (Pfeil markiert Futtervorlage, mod. nach Nielsen et al. 2003)

Insbesondere bei mehrfachen Untersuchungen eines Individuums oder einer Gruppe bzw. Herde zu unterschiedlichen Zeitpunkten sollte der Probenentnahmezeitpunkt relativ zur Fütterung berücksichtigt werden (LeBlanc 2006).

#### 2.4.2.2. Präanalytischer Einfluss der Probenentnahme, -behandlung, und -lagerung auf die NEFA und die BHB

Die Blutentnahme beim Rind erfolgt im wesentlichen durch die Punktion der V. jugularis externa („Halsvene“), der V. epigastrica cranialis superficialis („Eutervene“) oder der V. caudalis mediana („Schwanzvene“) (Redetzky et al. 2003). Obwohl die V. jugularis externa als bevorzugte Lokalisation angesehen wird, ist die Punktion dieses Gefäßes durch notwendige Zwangsmaßnahmen arbeitsaufwendig. Hierbei können Stressoren im Rahmen der Zwangsmaßnahmen ebenfalls einen störenden Einfluss auf einzelne Blutparameter darstellen. Die Catecholamin-induzierte Lipolyse kann bei starker Erregung und Fixation im Fressgitter einen substantiellen Einfluss auf die Konzentration der NEFA haben (Brickner et al. 2007). Für die Punktion der V. caudalis mediana und der V. epigastrica cranialis superficialis entfallen Zwangsmaßnahmen im weitesten Sinne. Die Stoffwechselaktivität des Euters ist bei der Verwendung von Blut aus der V. epigastrica cranialis superficialis ebenfalls zu berücksichtigen. Das Euter verwertet die BHB und die NEFA zur

Milchfettsynthese und zur Energiegewinnung. Zumindest für die BHB sind bei Stoffwechseluntersuchungen geringere Konzentrationen in der Eutervene im Vergleich zur Schwanzvene beschrieben (Kronfeld et al. 1968; Redetzky et al. 2003).

Tabelle 7: Literaturangaben zur Stabilität der NEFA und der BHB bei Lagerung des Vollblutes, Plasmas bzw. Serums bei Raum- (RT) oder Kühlschranktemperatur (KT)

	<b>Autor</b>	<b>Spezies</b>	<b>Material</b>	<b>RT</b>	<b>KT</b>
<b>NEFA</b>	Schulze 2008	<b>Rind</b>	Serum	48h*	48h*
	Schulze 2008	<b>Rind</b>	Vollblut	4h	k.A.
	Ehsani et al. 2008	<b>Rind</b>	Vollblut	12h	24h*
	Schröder und Staufenbiel 2006	<b>Rind</b>	Serum	8d*	8d*
	Schröder und Staufenbiel 2006	<b>Rind</b>	Vollblut	24h	8d
	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	Serum	24h	3d*
	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	Vollblut	< 24h	24h*
	Brenner und Reinhard 1976	<b>Rind</b>	Serum	2,5h	< 24h
	Brenner und Reinhard 1976	<b>Rind</b>	EDTA-Plasma	1,5h	24h
	Brenner und Reinhard 1976	<b>Rind</b>	EDTA-Vollblut	< 24h	24h
	Whitaker 1996	<b>Rind</b>	Vollblut	48h	48h
	Morris et al. 2002	Schaf	Serum	k.A.	7d ↑ 53%
	Morris et al. 2002	Schaf	NaF-Plasma	k.A.	7d ↑ 30%
	Menendez et al. 2001	Mensch	Serum	< 24h	48h
	Menendez et al. 2001	Mensch	EDTA-Plasma	< 24h	48h
Rogiers 1978	Mensch	Vollblut	2h	48h	
<b>BHB</b>	Schulze 2008	<b>Rind</b>	Serum	8h	8h
	Schulze 2008	<b>Rind</b>	Vollblut	< 4h	k.A.
	Ehsani et al. 2008	<b>Rind</b>	Vollblut	24h*	24h*
	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	Serum	72h*	72h*
	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	Vollblut	24h*	24h*
	Morris et al. 2002	Schaf	Serum	k.A.	7d ↓ 18%
	Morris et al. 2002	Schaf	NaF-Plasma	k.A.	7d ↓ 10%
	Laun et al. 2001	Mensch	EDTA-Plasma	< 3d	< 3d
	Laun et al. 2001	Mensch	EDTA-Vollblut	6h	6h
	Sacks et al. 2002	Mensch	Serum	k.A.	48h
Sacks et al. 2002	Mensch	Vollblut	k.A.	4h	

\* Versuchsende; ↑ Anstieg; ↓ Absinken

Die NEFA und die BHB können entweder im Serum oder im Plasma bestimmt werden (Duffield und LeBlanc 2006). Zur Trennung von Vollblut und Serum bzw. Plasma wird eine Zentrifugation bei 3000 Umdrehungen pro Minute über 5 – 10 Minuten empfohlen (Kraft und Dürr 2005). Die Zentrifugation sollte beim Rind nach 30 Minuten erfolgen (Vap und Weiser 2007), wobei bei der Verwendung von Serum die Blutprobe bis dahin bei Raumtemperatur vollständig geronnen sein sollte (Russell und Roussel 2007). Eine verzögerte Trennung von Vollblut und Serum bzw. Plasma kann einen störenden



Einfluss auf die Konzentration der NEFA und der BHB haben. Die Stabilität des Vollblutes ist abhängig von der Lagerungstemperatur (Morris et al. 2002; Stokol und Nydam 2005; Ehsani et al. 2008). Grundsätzlich sollte das Vollblut umgehend gekühlt werden und eine Zeitspanne von 24h zwischen der Blutentnahme und der Zentrifugation nicht überschritten werden (Tab. 7).

Hämolytische Proben sollten verworfen werden, da für die NEFA und die BHB mit ansteigendem Hämolysegrad der Probe eine Konzentrationserhöhung einhergeht (Jacobs et al. 1992; Stokol und Nydam 2006). Die Verwendung von unterschiedlichen Antikoagulantien (Fluorid, EDTA, Heparin) hat keinen oder nur einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die NEFA- und die BHB-Bestimmung, wenn die Proben umgehend zentrifugiert und analysiert werden (Tab. 8).

Tabelle 8: Literaturangaben zum Einfluss der Antikoagulantien Fluorid, Heparin und EDTA auf die Konzentration der NEFA und der BHB im Vergleich zum Serum

	<b>Autor</b>	<b>Spezies</b>	<b>Fluorid</b>	<b>Heparin</b>	<b>EDTA</b>
<b>NEFA</b>	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	k.A.	-	-
	Brenner und Reinhard 1976	<b>Rind</b>	-	-	-
	Morris et al. 2002	Schaf	-	-	-
	Rogiers 1978	Mensch	-	-	-
<b>BHB</b>	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	-	-	-
	Gelfert und Staufenbiel 1998	<b>Rind</b>	(K <sup>a</sup> ) ↓ 22%	-	↓ 17%
	Morris et al. 2002	Schaf	-	-	-
	Sacks et al. 2002	Mensch	-	-	-

- kein Einfluss; ↓ niedriger gegenüber Serum; <sup>a</sup> Kalium-Fluorid

Die Stabilität des Serums bzw. Plasmas ist abhängig von der Lagerungstemperatur und dem verwendeten Antikoagulant (Morris et al. 2002; Stokol und Nydam 2005; Schröder und Staufenbiel 2006a; Ehsani et al. 2008; Schulze 2008). Angaben zur Stabilität von Serum und Plasma bei Lagerung unter Raumtemperatur und im Kühlschrank sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Zumindest für die NEFA steigt die Konzentration mit ansteigender Temperatur und Lagerungsdauer (Stokol und Nydam 2005; Ehsani et al. 2008). Dieser Anstieg wird erklärt durch eine spontane oder Enzym-katalysierte (Lipoprotein-Lipase, Lecithinase) Hydrolyse von veresterten Fetten (McGann und Hodson 1991). Dieser Prozess wird vermutlich durch Heparin beschleunigt (Gleeson 1987). Heparin aktiviert die Lipoprotein-Lipase, welche am kapillären Endothel verankert ist (Watson et al. 1995). Eine in-vitro Konzentrationserhöhung von Heparin in humanen Plasmaproben bei einer Lagerung für 2h bei 4°C führte zu keiner Erhöhung der NEFA (Rogiers 1978). Dennoch waren bovine Heparin-Plasmaproben gegenüber EDTA-Plasma und Serum weniger stabil bei einer Lagerung für 72h bei 24°C (Stokol und Nydam 2005). Obwohl der Mechanismus noch nicht ganz geklärt zu sein scheint, sollten Heparin-Proben für die NEFA-Bestimmung nicht verwendet werden, wenn die Analyse der Proben nicht umgehend möglich ist (Stokol und Nydam 2005).

Die Tiefgefrierung von Blutproben ist mitunter notwendig zur gleichzeitigen Analyse großer Probenmengen bei wissenschaftlichen Untersuchungen über einen langen Zeitraum. Aus praktischer Sicht kann dies notwendig sein bei der antepartalen NEFA-Bestimmung, um den Zeitpunkt der Probenentnahme relativ zur Kalbung in die diagnostische Bewertung zu integrieren bzw. um eine ausreichende Probenanzahl der Vorbereiter zu erhalten (Oetzel 2004). Tiefgefrorene Serum- oder Plasmaproben vom Rind sind mindestens für einen Monat stabil für die Bestimmung der NEFA und der BHB (Tab. 9).

Tabelle 9: Literaturangaben zur Stabilität der NEFA und der BHB bei Tiefgefrierung

	<b>Autor</b>	<b>Spezies</b>	<b>Material</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeitraum</b>
<b>NEFA</b>	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	Serum	-40°C	28 d*
	Morris et al. 2002	Schaf	NaF-Plasma	-20°C/-80°C	180 d*
	Menendez et al. 2001	Mensch	EDTA-Plasma	-20°C	14 d*
	Menendez et al. 2001	Mensch	Serum	-20°C	14 d*
	Rogiers 1978	Mensch	Heparin-Plasma	-20°C	10 d*
<b>BHB</b>	Stokol und Nydam 2005	<b>Rind</b>	Serum	-40°C	28 d*
	Morris et al. 2002	Schaf	NaF-Plasma	-20°C/-80°C	180 d*
	Laun et al. 2001	Mensch	EDTA-Plasma	-17°C/-40°C/-80°C	21 d*
	Sacks et al. 2002	Mensch	EDTA-Plasma	-20°C	einige Wochen
	Sacks et al. 2002	Mensch	Serum	-20°C	einige Wochen

\* Versuchsende

### 2.4.3. Überwachung der Stoffwechselgesundheit durch die NEFA und die BHB in der Transitperiode

Die dramatischen endokrinen und metabolischen Veränderungen, welche mit der Kalbung einhergehen, bieten es aus diagnostischer und physiologischer Sicht an, den antepartalen und postpartalen Zeitraum der Transitperiode getrennt zu betrachten (Goff und Horst 1997; Quiroz-Rocha et al. 2009).

Die Veränderungen der NEFA- und BHB-Konzentrationen im peripartalen Zeitraum sind Teil eines adaptativen Prozesses. Daher sollten die Grenzwerte in der Stoffwechselüberwachung die Laktationsdynamik der Parameter beachten (Quiroz-Rocha et al. 2009) und an Hand von Gesundheitsstörungen und Leistungsminderungen definiert werden (Duffield et al. 2009). Die NEFA und die BHB können bei der Stoffwechselüberwachung von Einzeltieren oder auf Herdenebene genutzt werden. Beim Einzeltier dienen sie zur Identifikation von Tieren mit einem erhöhten Risiko für peripartale Erkrankungen. Auf Herdenebene werden sie zur Beurteilung der Stoffwechselgesundheit einer Gruppe und dem zugrunde liegenden Management (z.B. Fütterung, Haltung) genutzt.

### 2.4.3.1. Einzeltierüberwachung - Ante Partum

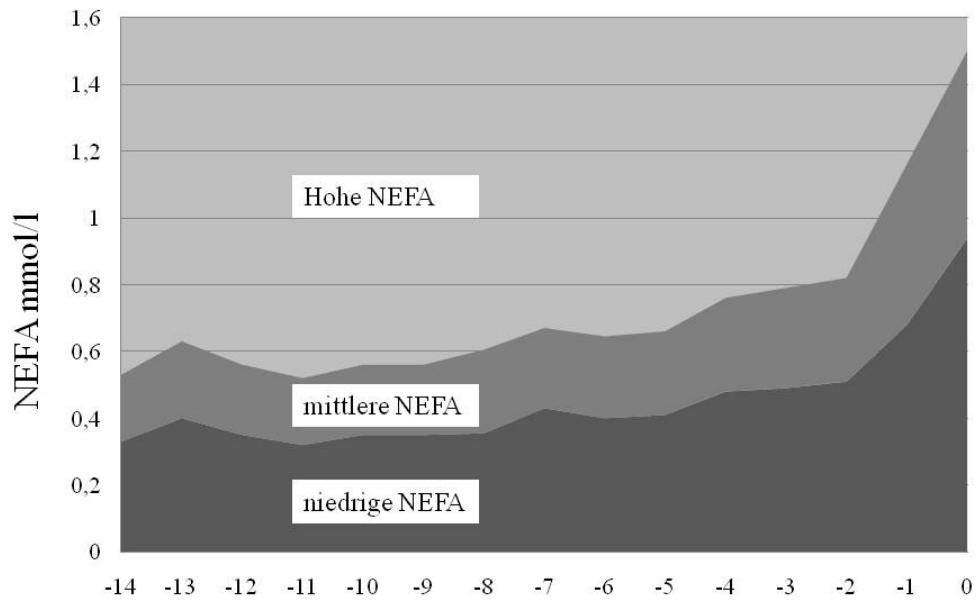
Die antepartale Stoffwechselüberwachung von Einzeltieren hat die größte Bedeutung in der letzten Woche vor dem Partus (Oetzel 2004; Duffield und LeBlanc 2006).

Zur antepartalen Einschätzung des Risikos für peripartale Erkrankungen im Zusammenhang mit der Maladaptation des Energiestoffwechsels sind nach Meinung mehrerer Autoren (Overton 2001; Connor 2004; LeBlanc et al. 2005; Duffield 2006; LeBlanc 2006; Schröder 2006; van Saun 2007a; Moyes et al. 2009; Ospina et al. 2010b) nur die NEFA geeignet. Tabelle 10 zeigt eine Übersicht zu den Angaben verschiedener Autoren bezüglich antepartaler NEFA-Bestimmungen.

Tabelle 10: Übersicht zu NEFA-Grenzwerten im Serum/Plasma bei Milchkühen vor der Kalbung

Autor	Zeit d a.p.	Grenzwert	Kommentar
Quiroz-Rocha et al. 2009	0 bis 7	1,0mmol/l	$x \pm 2s$ bei gesunden Kühen
Duffield 2004	0 bis 7	0,7mmol/l	5faches Risiko einer SCK
van Saun 2004	3 bis 21	0,6mmol/l	1,7faches Risiko einer Erkrankung
LeBlanc et al. 2005	0 bis 6	0,5mmol/l	3,6faches Risiko einer LMV
LeBlanc et al. 2005	4 bis 10	0,5mmol/l	4,1faches Risiko einer LMV
van Saun 2004	3 bis 21	0,4mmol/l	1,6faches Risiko einer Erkrankung
Cameron et al. 1998	0 bis 7	0,4mmol/l	2faches Risiko einer LMV
LeBlanc et al. 2004	0 bis 7	0,4mmol/l	1,8faches Risiko einer Ret.Sec.
Carson 2008	0 bis 7	0,4mmol/l	1,2kg/d weniger Milch bis 120d p.p.
Duffield 2009	0 bis 7	0,4mmol/l	2faches Risiko einer Merzung bis 60d p.p.
Ospina et al. 2010	2 bis 14	0,37mmol/l	2,2faches Risiko einer Metritis/ Ret. Sec
Ospina et al. 2010	2 bis 14	0,27mmol/l	2faches Risiko einer LMV
Ospina et al. 2010	2 bis 14	0,26mmol/l	1,8faches Risiko einer klinischen Ketose
Drackley 2000	0 bis 7	0,2 - 0,3mmol/l	

Dyk et al. (1995) stellte fest, dass die antepartale Fettmobilisation mit einem erhöhten Risiko für peripartale Gesundheitsstörungen assoziiert ist (Abb. 6 und 7). Kühe mit postpartalen Erkrankungen, wie Ketose, LMV und Nachgeburtsverhaltung, wiesen in den letzten 14d a.p. höhere NEFA-Werte auf, als Kühe ohne diese Störungen. Diese Beziehung gilt nicht für die Hypocalcämie (Dyk 1995).



## Tage ante partum

Abbildung 6: Durchschnittliche NEFA-Konzentration im Serum bei Milchkühen und Einteilung in niedrige (n = 741), mittlere (n = 435) und hohe (n = 380) NEFA-Gruppen (mod. nach Dyk 1995)

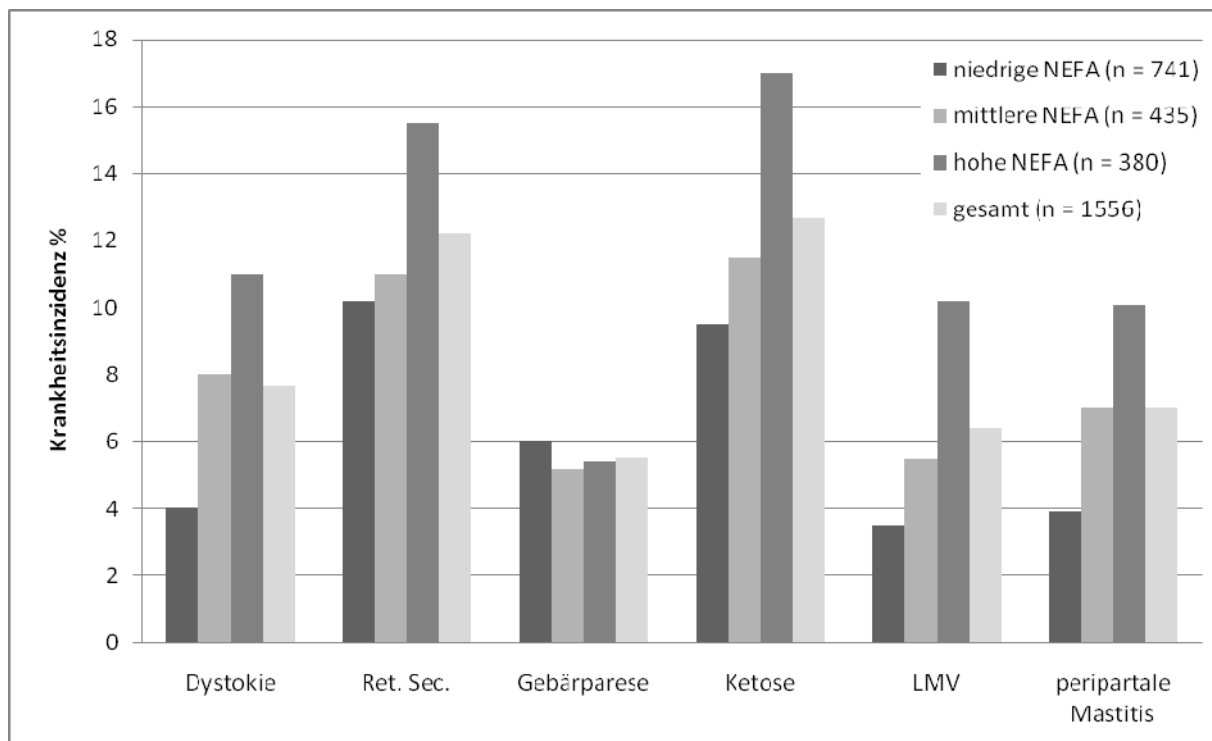


Abbildung 7: Krankheitsinzidenz bei Milchkühen nach NEFA-Gruppen (mod. nach Dyk 1995)

Die Eutergesundheit und die Gesundheit der Gebärmutter in der Früh-laktation sind ebenfalls mit der antepartalen Stoffwechselgesundheit verbunden. Kühe, die post partum an puerperaler Metritis oder

subklinischer Endometritis erkrankten, hatten in den letzten beiden Wochen a.p. erhöhte NEFA-Konzentrationen (Hammon et al. 2006). Jungkühe mit erhöhten Zellzahlen in der ersten Milchkontrolle hatten in der letzten Woche a.p. erhöhte NEFA-Konzentrationen (Nyman et al. 2008). Pluripare Kühe, die in der ersten Woche eine klinische oder subklinische Mastitis hatten, wiesen gegenüber der gesunden Kontrollgruppe schon a.p. erhöhte NEFA-Konzentrationen auf (Moyes et al. 2009).

In einer Untersuchung von LeBlanc et al. (2005) zur Identifizierung von Kühen mit einem erhöhten Risiko für eine linksseitige Labmagenverlagerung waren ante partum nur die NEFA geeignet. Bei Kühen mit einer späteren Labmagenverlagerung wichen NEFA-Werte ab dem 14.d a.p. und BHB-Werte erst ab der Kalbung vom Mittelwert der Kühe ohne Labmagenverlagerung ab.

Die Erfassung der antepartalen TM-Aufnahme liefert ebenfalls hilfreiche Informationen zum Erkrankungsrisiko im postpartalen Zeitraum (Huzzey et al. 2007; Goldhawk et al. 2009). Milchkühe, die post partum an einer schweren Metritis erkrankten, hatten in der letzten Woche ante partum eine um 3,1kg TM/d reduzierte TM-Aufnahme gegenüber den gesunden Kühen (14,3kg TM/d) (Huzzey et al. 2007). Tiere mit einer subklinischen Ketose in der ersten Woche p.p. hatten in der letzten Woche ante partum eine um 3kg TM/d reduzierte TM-Aufnahme gegenüber gesunden Kühen (16,8kg TM/d) (Goldhawk et al. 2009). In einer anderen Untersuchung waren TM-Aufnahmen von < 12kg/d in den 3 Wochen a.p. signifikant mit einem erhöhten Risiko (OR 5,7) für die subklinische Ketose verbunden (Osborne 2003). Die Erfassung der TM-Aufnahme bereitet in praxi allerdings große Schwierigkeiten (Reist et al. 2002). Von den labordiagnostisch nutzbaren Parametern sind die NEFA geeignet, um die TM-Aufnahme von Kühen in der Vorbereitergruppe einzuschätzen (Overton 2001).

Nach Schröder (2006) gehen hohe NEFA-Werte eine Woche a.p. mit erhöhtem Leberfettgehalt zur Abkalbung einher. Im Unterschied dazu, bestehen zwischen den BHB-Konzentrationen ante partum und dem peripartalen Leberfettgehalt keine signifikanten Beziehungen. Die antepartale NEFA-Bestimmung bietet sich an, um bei Tieren in der Vorbereitergruppe Informationen über die antepartale Lipolyserate und die Gefahr einer Leberverfettung zu erhalten (Schröder 2006). Die Leberverfettung kann auch schon antepartal einsetzen, wobei dies immer mit einer gesteigerten Lipolyse verbunden ist und zeitlich den NEFA-Erhöhungen folgt (Vazquez-Anon et al. 1994).

Das Problem bei der Interpretation von antepartalen Stoffwechseluntersuchungen ist die Unfähigkeit, das Kalbedatum genau vorherzusagen (LeBlanc et al. 2005; Duffield 2006). Die Auswertung der antepartalen NEFA-Bestimmung kann einmal mit einem geschätzten Kalbedatum oder bei retrospektiver Betrachtung mit dem bekannten Kalbedatum erfolgen. Zur Einschätzung des Risikos für eine Labmagenverlagerung liefert die Probennahme ungefähr eine Woche vor der Kalbung, im Vergleich zur Probennahme mit Kenntnis des Kalbedatums und Ausschluss der Kühe, die unmittelbar vor der Kalbung waren, ähnliche Informationen (LeBlanc et al. 2005). Der Ausschluss der Proben 2d vor der Kalbung erhöhte das Odd's Ratio von 4,1 (Sensitivität 46,3%; Spezifität 82,4 %) auf 5,1 (Sensitivität 43,1%; Spezifität 87,0%). Dies wird mit der ansteigenden Variation der NEFA zur

Kalbung erklärt. Drackley (2000) hingegen empfiehlt Tiere 3 d vor und 3 d nach der Kalbung von der Untersuchung auszuschließen.

Zur antepartalen Früherkennung von möglichen „Risikotieren“ (LMV, Ketose, Leberverfettung), die schon frühzeitig in eine NEB gleiten, sind nur die NEFA geeignet (Overton 2001; LeBlanc et al. 2005; Duffield 2006). Die möglichen Konsequenzen aus antepartal erhöhten NEFA-Werten für eine frühzeitige Therapie oder Metaphylaxe sind noch weitestgehend unklar (LeBlanc et al. 2005). Verschiedene Ansätze werden diskutiert, wie z.B. der Einsatz von Propylenglykol (Grummer et al. 1994).

#### **2.4.3.2. Einzeltierüberwachung – Post Partum**

Der Fokus der postpartalen Stoffwechselüberwachung liegt in dem Zeitraum von der Kalbung bis zum 50. d p.p. (Oetzel 2004). Die Inzidenz der wesentlichen Erkrankungen (subklinische und klinische Ketose, Labmagenverlagerung), welche im Zusammenhang mit der Maladaptation an die NEB stehen, ist im ersten Laktationsmonat am größten (LeBlanc et al. 2005; Duffield und LeBlanc 2009). Überwachungsprogramme zur Prävention der Erkrankungen müssen dementsprechend früh in der Laktation integriert werden. Tabelle 11 zeigt eine Übersicht zu den Angaben verschiedener Autoren bezüglich der NEFA und der BHB zur Diagnostik in der Früh-laktation.

Die BHB ist zentraler Bestandteil eines Überwachungsmodells in den ersten Wochen post partum, um das Risiko für das Auftreten von klinischen oder subklinischen Erkrankungen zu beurteilen (Geishauser et al. 2001; Leslie 2002; Oetzel 2004; Duffield 2006; Mulligan et al. 2006; van Saun 2007a). Durch eine Untersuchung aller Tiere in der ersten und zweiten Laktationswoche unter Anwendung der BHB gibt es nur ein geringes Risiko, dass Tiere mit einer subklinischen Ketose unentdeckt bleiben (Geishauser et al. 2001). Die Verfügbarkeit eines schnellen und zuverlässigen tiernahen Testsystems für die BHB mit sehr guten diagnostischen Eigenschaften (Iwersen et al. 2009) macht den Einsatz aus praktischer Sicht umso attraktiver.

Der Einsatz der NEFA in der Diagnostik p.p. wird in der Literatur unterschiedlich diskutiert (Oetzel 2004; Schröder 2006; Ospina et al. 2010b). Für Oetzel (2004) stellen die NEFA ein sekundäres Testverfahren dar, welches im Anschluss an die BHB genutzt werden kann, um den Zeitraum der Energieunterversorgung näher zu definieren. Die Interpretation von postpartal gewonnenen NEFA-Proben ist besonders schwierig, wegen der erwarteten NEB und der großen Variation (Oetzel 2004). Der Variationskoeffizient für die NEFA in der Früh-laktation (weniger als 60d p.p.) liegt bei 110% und für die BHB im selben Zeitraum bei 33% (Herdt 2000b).

Tabelle 11: Übersicht zu Grenzwerten der NEFA und der BHB im Serum/Plasma bei Milchkühen in der Früh lactation

<b>Autor</b>	<b>Parameter</b>	<b>Zeitpunkt d</b>	<b>Grenzwert</b>	<b>Kommentar</b>
Quiroz-Rocha et al. 2009	NEFA	1 bis 7	1,4mmol/l	$x \pm 2s$ bei gesunden Kühen
Carson 2008	NEFA	1 bis 7	1,0mmol/l	4,6faches Risiko einer LMV
LeBlanc et al. 2005	NEFA	1 bis 7	1,0mmol/l	4,8faches Risiko einer LMV
Ospina et al. 2010b	NEFA	3 bis 14	0,72mmol/l	9,7faches Risiko einer LMV
van Saun 2004	NEFA	3 bis 30	0,6mmol/l	1,9faches Risiko einer Erkrankung
Ospina et al. 2010b	NEFA	3 bis 14	0,57mmol/l	5faches Risiko einer CK
van Saun 2004	NEFA	3 bis 30	0,4mmol/l	1,5faches Risiko einer Erkrankung
Ospina et al. 2010b	NEFA	3 bis 14	0,36mmol/l	17faches Risiko einer Metritis
Drackley 2000	NEFA	7 bis 20	0,7mmol/l	
Drackley 2000	NEFA	ab 21	0,3mmol/l	
Duffield et al. 2009	BHB	8 bis 14	2,0mmol/l	3,3kg/d geringere Milchleistung
Duffield et al. 2009	BHB	8 bis 14	1,8mmol/l	6,22faches Risiko einer LMV
Duffield et al. 2009	BHB	8 bis 14	1,4mmol/l	5,98faches Risiko einer CK
Duffield et al. 2009	BHB	1 bis 7	1,4mmol/l	1,8kg/d geringere Milchleistung
Duffield et al. 2009	BHB	1 bis 7	1,4mmol/l	4,25faches Risiko einer CK
Geishauser et al. 1997	BHB	1 bis 7	1,4mmol/l	4faches Risiko einer LMV
Duffield et al. 2009	BHB	1 bis 7	1,2mmol/l	2,5faches Risiko einer LMV
Duffield et al. 2009	BHB	1 bis 7	1,2mmol/l	3,35faches Risiko einer Metritis
LeBlanc et al. 2005	BHB	1 bis 7	1,2mmol/l	8faches Risiko einer LMV
Geishauser et al. 1997	BHB	1 bis 7	1,2mmol/l	3faches Risiko einer LMV
Quiroz-Rocha et al. 2009	BHB	1 bis 7	1,17mmol/l	$x \pm 2s$ bei gesunden Kühen
Walsh et al. 2007	BHB	1 bis 7	1,0mmol/l	geringerer Erstbesamungserfolg
Ospina et al. 2010b	BHB	3 bis 14	0,96mmol/l	6,9faches Risiko einer LMV
Ospina et al. 2010b	BHB	3 bis 14	0,96mmol/l	4,9faches Risiko einer CK
Ospina et al. 2010b	BHB	3 bis 14	0,67mmol/l	2,3faches Risiko einer Metritis

Die NEFA bieten nach der Kalbung gegenüber der BHB keinen Vorteil bei der Beurteilung des Leberfettgehaltes (Schröder und Staufenbiel 2006a). Zur Einschätzung des Risikos für Erkrankungen (LMV, klinische Ketose, Metritis) in der Früh lactation sind sowohl die NEFA als auch die BHB geeignet (Tab. 12) (Van Winden et al. 2003; LeBlanc et al. 2005; Duffield et al. 2009; Ospina et al. 2010b). Die Qualität eines Tests zur Vorhersage einer Erkrankung ergibt sich aus den diagnostischen Eigenschaften des Tests (Sensitivität und Spezifität) und dem damit verbundenen Risiko für die Erkrankung (Greiner et al. 2000). Nach neueren Untersuchungen ist die postpartale NEFA-Bestimmung zur Risikoeinschätzung für Erkrankungen, Reproduktionsstörungen und Milchleistungsverluste besser geeignet als die antepartale NEFA-Bestimmung bzw. die postpartale BHB-Bestimmung (Ospina et al. 2010b; Ospina et al. 2010a).

Tabelle 12: Risikomaß, Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp) für die NEFA und die BHB zur Vorhersage der Labmagenverlagerung, der klinischen Ketose und der Metritis in der Frühlaktation

Erkrankung	Parameter	Zeit d p.p.	Grenzwert mmol/l	Risikomaß <sup>1</sup>	Se %	Sp %	Autor
Labmagen- verlagerung	NEFA	3-14	0,72	RR 9,7	80	73	Ospina et al. 2010b
	NEFA	1-7	1,00	OR 4,8	56	78	LeBlanc et al. 2005
	BHB	3-14	0,96	RR 6,9	71	80	Ospina et al. 2010b
	BHB	1-7	1,20	OR 2,6	44	77	Duffield et al. 2009
	BHB	8-14	1,80	OR 6,2	45	88	Duffield et al. 2009
Klinische Ketose	NEFA	3-14	0,57	RR 5,0	74	59	Ospina et al. 2010b
	BHB	3-14	0,96	RR 4,9	57	80	Ospina et al. 2010b
	BHB	1-7	1,40	OR 4,3	46	83	Duffield et al. 2009
	BHB	8-14	1,40	OR 6,0	57	82	Duffield et al. 2009
Metritis	NEFA	3-14	0,36	RR 17	97	30	Ospina et al. 2010b
	BHB	3-14	0,67	RR 2,3	63	59	Ospina et al. 2010b
	BHB	1-7	1,20	OR 3,4	52	76	Duffield et al. 2009

<sup>1</sup> RR – relatives Risiko; OR – Odds Ratio

Die NEFA bieten einen zeitlichen Vorteil bei der Diagnostik eines akuten Energiedefizits und bei der Differenzierung zum Einfluss der ruminogenen Ketogenese auf Stoffwechseluntersuchungen unter Anwendung der BHB (Veenhuizen et al. 1991; Nielsen et al. 2003). Bei Futterrestriktion und Verabreichung von 1,3-Butandiol an Tag 15 p.p. zur Induktion einer Ketose entspricht die Dynamik der NEFA, der BHB und des Leberfettgehaltes den pathophysiologischen Zusammenhängen bei der Entstehung der Leberverfettung (Veenhuizen et al. 1991). Danach erreichen die NEFA (5d nach der Induktion) zuerst ihr Maximum, gefolgt vom Leberfettgehalt (13d nach der Induktion) und der BHB (27d nach der Induktion).

Bei einer Futterrestriktion (Fütterung von 65% der ad libitum TM-Aufnahme) post partum unterscheiden sich die NEFA und die BHB in ihrem Verhalten (Nielsen et al. 2003). Während die NEFA schon am Tag der Futterrestriktion ansteigen (Anstieg um 121% bis zum Tag 3), trifft dies für die BHB (Anstieg um 90% bis zum Tag 3) erst am darauf folgenden Tag zu (Abb. 8 und 9). Neben der Tatsache, dass die NEFA bzw. das aus deren Metabolismus stammende Acetyl-CoA ein wichtiges Substrat für die hepatogene Ketogenese sind, wird für den verzögerten Anstieg der BHB die sinkende ruminogene Ketogenese an Tag 1 der Futterrestriktion angegeben.



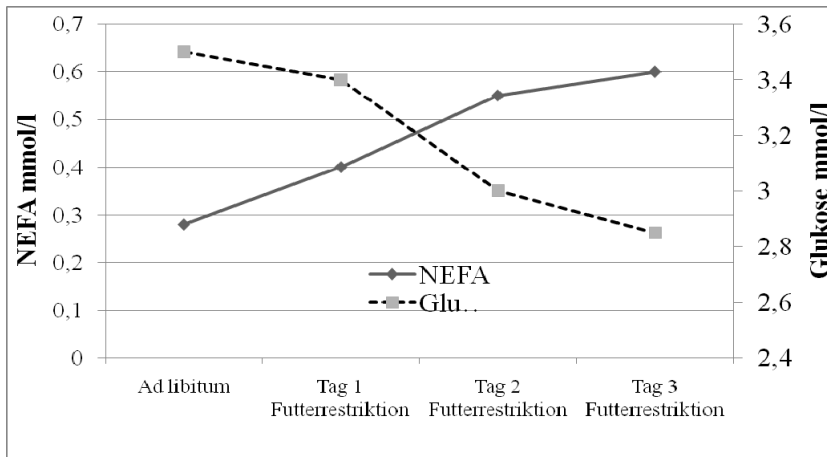


Abbildung 8: Einfluss der Futterrestriktion (65% der ad libitum TM-Aufnahme) auf die NEFA und die Glukose im Serum (mod. nach Nielsen et al. 2003)

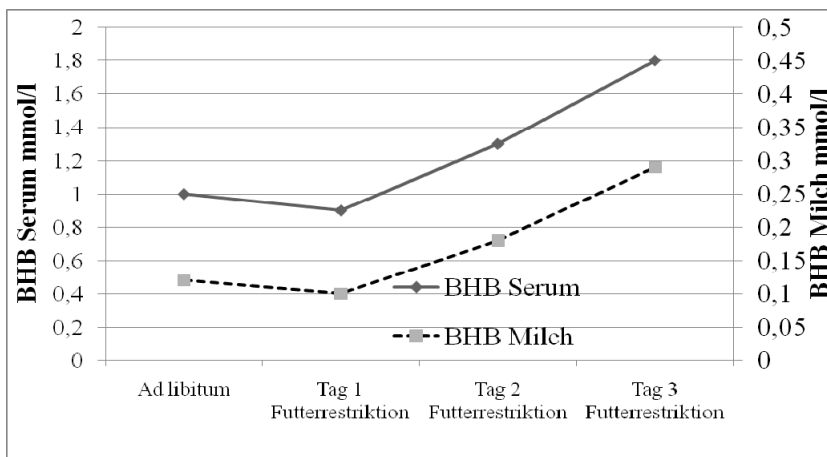


Abbildung 9: Einfluss der Futterrestriktion (65% der ad libitum TM-Aufnahme) auf die BHB im Serum und in der Milch (mod. nach Nielsen et al. 2003)

Stoffwechseluntersuchungen im postpartalen Abschnitt der Transitperiode zur Identifikation von Einzeltieren mit einem erhöhten Risiko für Erkrankungen sollten die BHB als primäres Diagnostikum verwenden. Im Anschluss daran kann sich sekundär die Verwendung der NEFA, um weitere Informationen zum Adaptationserfolg an die metabolischen Herausforderungen der Früh lactation zu erhalten. Hier sind die indirekte Einschätzung der Trockenmasseaufnahme und die Differenzierung zur ruminogenen Ketogenese hervorzuheben.

### 2.4.3.3. Stoffwechselüberwachung auf Herdenebene

Die Überwachung und die Stabilisierung der Stoffwechselgesundheit ist zentraler Bestandteil bei der Optimierung der Herdengesundheit und der Leistung von Milchviehherden (Staufenbiel 1999). Insbesondere die subklinischen Stoffwechselstörungen haben einen großen Einfluss auf die Ökonomie der Milchproduktion innerhalb einer Herde (Cook et al. 2006). Die meisten subklinischen

Erkrankungen bleiben verborgen und führen zu anhaltenden negativen Effekten für die Herdengesundheit, -fruchtbarkeit und -leistung, welche die ökonomischen Verluste für die klinischen Erkrankungen übersteigen (Duffield 2000; Walsh et al. 2007; Duffield et al. 2009). Die Inzidenz der klinischen Erkrankungen steht oftmals in keinem Zusammenhang zu den subklinischen Erkrankungen in einer Herde (Cook et al. 2006). In einer Feldstudie mit 25 Herden betrug die kumulative Inzidenz der subklinischen Ketose (BHB-Messung in Woche 1, 2, 3, 6 p.p.) 45%, wohingegen die Inzidenz der klinischen Ketose nur 1,5% betrug (Duffield et al. 1998). Innerhalb der Herden gab es keine eindeutigen Zusammenhänge zwischen der Inzidenz der subklinischen und klinischen Ketose (Abb. 10).

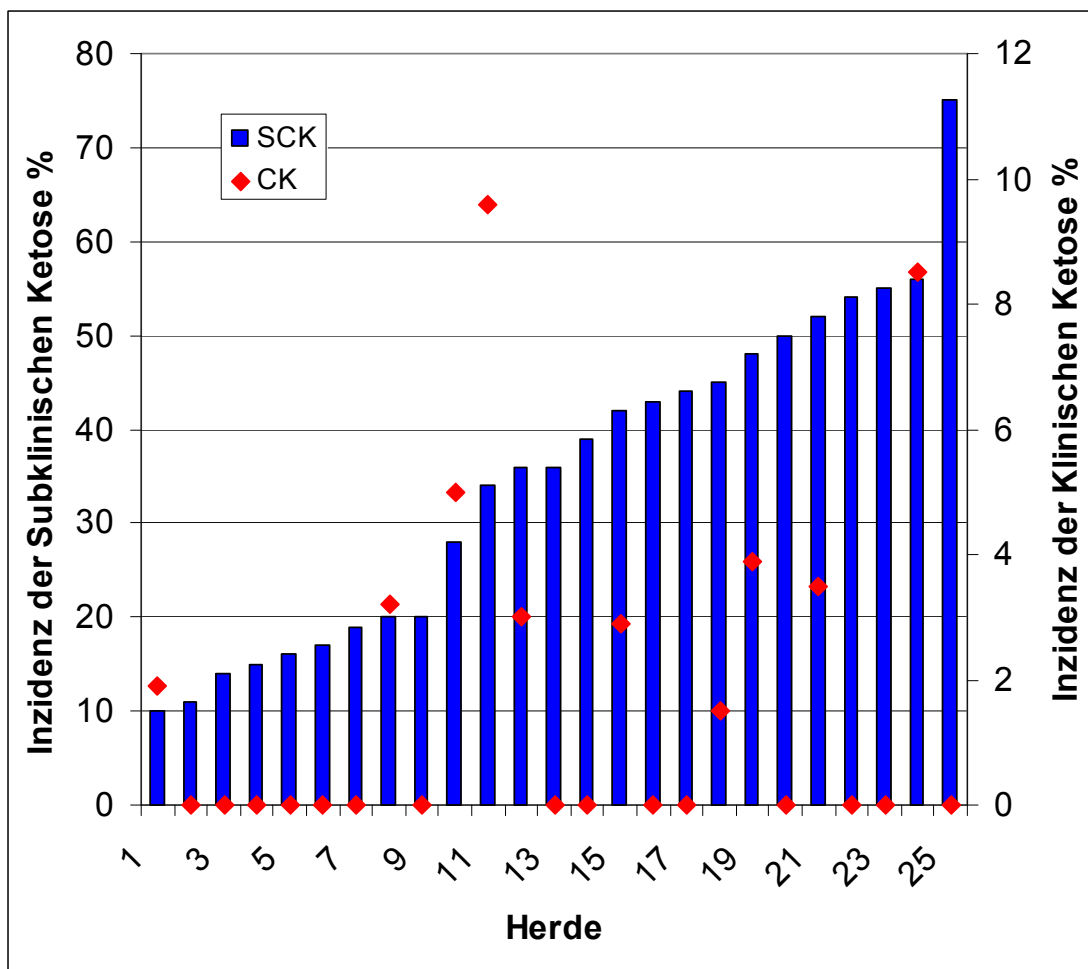


Abbildung 10: Inzidenz der subklinischen (SCK) und klinischen Ketose (CK) in 25 Milchviehherden (mod. nach Duffield 2005)

Herdenmanager in kleinen Herden tendieren dazu, die Inzidenz der klinischen Ketose zu überschätzen, während Herdenmanager in großen Herden die Inzidenz unterschätzen (Oetzel 2004). Daher ist es essentiell, eine Maßnahme oder Empfehlung durch den Tierarzt unabhängig von der Wahrnehmung der Herdenmanager mit einer objektiven Messung der Prävalenz der subklinischen Ketose oder an Hand von Stoffwechseluntersuchungen zu begründen (Oetzel 2004). Die exakte Definition der

Prävalenz einer subklinischen Erkrankung innerhalb einer Herde ist nur durch die labordiagnostische Untersuchung aller Tiere möglich. Dies ist sehr kosten- und zeitaufwendig. Daher kommen Stichprobentestverfahren zur Anwendung (Oetzel 2004; Duffield und LeBlanc 2006; Van Saun 2007b). Diese beinhalten zwar das Risiko einer diagnostischen Unsicherheit, bieten aber den Vorteil eines ausreichenden Informationsgehaltes bei vertretbarem Aufwand.

Die Stoffwechseluntersuchungen unter Anwendung von Stichproben sind dazu geeignet, um Herden mit sehr hoher oder niedriger Prävalenz der subklinischen Ketose zu identifizieren (Oetzel 2004).

Bei der Überwachung der Stoffwechselfgesundheit von Milchviehherden hat sich die Kombination von verschiedenen Parametern im Sinne eines metabolischen Profils bewährt, wobei die NEFA und die BHB große Bedeutung haben (Oetzel 2004; Duffield and LeBlanc 2006; van Saun 2007a).

Die Ergebnisse der Stichprobentestverfahren beruhen entweder auf dem Mittel- oder Poolwert der untersuchten Stichprobe oder auf dem Anteil an Tieren über einem Grenzwert in der untersuchten Stichprobe (Oetzel 2004).

#### **2.4.3.3.1. Stichprobentestverfahren unter Verwendung der Anzahl an Tieren mit abnormen Werten in der Stichprobe**

Bei der Beurteilung des Anteils der Einzeltiere in einer Stichprobe über einem Referenzwert werden mindestens 12 Tiere empfohlen (Oetzel 2004). Die Berechnung der Stichprobengröße zur Erkennung einer Erkrankung ist bei diesem Verfahren abhängig von der Prävalenz der Erkrankung, der Gruppengröße und der statistischen Sicherheit (Dohoo et al. 2003). Sie berechnet sich nach folgender Formel:

$$n = (1 - \alpha^{1/D}) \times (N - (D - 1)/2)$$

Abkürzungen: n = Stichprobengröße;  $\alpha = 1 - \text{Konfidenz}$ ; D = geschätzte Anzahl an erkrankten Tieren in der Gruppe (Populationsgröße x geschätzte Prävalenz); N = Populationsgröße

Die von Oetzel (2004) gewählte Anzahl von 12 Tieren resultiert aus folgender Annahme: bei einer Gruppengröße von 500 Tieren (z.B. Frischlaktierende), einer kritischen Prävalenz der SCK von 10% und einer statistischen Sicherheit von 75% kommt man nach oben genannter Formel auf eine Stichprobengröße von 13 (Tab. 13).

Aus Tabelle 13 ist ersichtlich, dass die geschätzte Prävalenz der Erkrankung einen wesentlich höheren Einfluss auf die Stichprobengröße besitzt, als die Größe der Population. Die Einflüsse der beiden Faktoren auf die Stichprobengröße bleiben bei dem von Oetzel (2004) vorgeschlagenen Verfahren allerdings unberücksichtigt.

Tabelle 13: Stichprobengröße bei 75% Konfidenz in Abhängigkeit von der geschätzten Prävalenz und der Populationsgröße (Dohoo et al. 2003)

Populationsgröße	geschätzte Prävalenz in %					
	5	10	15	20	25	30
25	16,67	10,32	7,30	5,57	4,45	3,67
50	20,96	11,62	7,89	5,89	4,65	3,80
75	22,75	12,11	8,10	6,00	4,71	3,84
100	23,73	12,36	8,21	6,06	4,75	3,86
125	24,34	12,52	8,28	6,10	4,77	3,87
250	25,64	12,84	8,41	6,17	4,81	3,90
500	26,32	13,00	8,48	6,20	4,83	3,91

Beruhend auf der leichteren Interpretation des relativen Anteils in der Stichprobe weicht Oetzel (2004) davon ab und empfiehlt eine Stichprobengröße von 12. Die laut Oetzel (2004) kritische Prävalenz der SCK von 10% beruht auf seinen klinischen Erfahrungen. Eine wissenschaftlich begründete kritische Prävalenz der SCK auf Herdenebene existiert nicht. Allerdings kann man davon ausgehen, dass mit steigender Anzahl an Tieren mit SCK in der Früh-laktation das Risiko für peripartale Erkrankungen mit Leistungsdepression und Fruchtbarkeitsstörungen zunimmt (LeBlanc et al. 2005; Walsh et al. 2007; Duffield et al. 2009).

Empfehlungen zur Anwendung von Stichprobentestverfahren der NEFA und der BHB und der Beurteilung des Anteils an Tieren mit abnormen Werten in der Stichprobe sind in Tabelle 14 dargestellt. Bei Definition einer geeigneten kritischen Prävalenz können auch andere Einzeltierreferenzwerte genutzt werden (Tab. 10 und 11).

#### **2.4.2.3.2. Stichprobentestverfahren unter Verwendung des Mittel- oder Poolwertes der Stichprobe**

Die Stichprobengröße ist bei Verwendung von Mittel- oder Poolwerten abhängig von der Varianz und dem Verteilungstyp des Parameters, dem Risiko für Fehlentscheidungen 1. und 2. Art und der zu sichernden Mindestabweichung (Willer 1982). Das Risiko erster Art ( $\alpha$ ) kennzeichnet dabei den „falschen Alarm“ und das Risiko zweiter Art ( $\beta$ ) die übersehene Abweichung. Für die Stoffwechselüberwachung ist die Fehlentscheidung zweiter Art bedeutungsvoller als die Fehlentscheidung erster Art. Bei einseitiger Fragestellung wird in der Regel  $\beta < \alpha$  gewählt und häufig mit  $\alpha = 0,1$  und  $\beta = 0,025$  festgelegt (Rossow et al. 1987). Die praktische relevante Differenz beträgt beispielsweise für die BHB eine Standardabweichung (Willer 1982).

Die Formel zur Berechnung des Stichprobenumfangs bei normalverteilten Zufallsvariablen und solchen mit mäßiger Schiefe lautet:

$$n = \sigma^2 / d^2 (u_{1-\alpha} + u_{1-\beta})^2$$

Abkürzungen:  $n$  = Stichprobengröße;  $\sigma^2$  = Varianz der stoffwechselgesunden Population;  $d$  = praktisch relevante Differenz zwischen Mittelwert der stoffwechselgesunden Population und dem Stichprobenmittelwert;  $(u_{1-\alpha} + u_{1-\beta})^2$  = Quantile der Normalverteilung (bei  $\alpha = 0,1$  und  $\beta = 0,025$  entspricht dies 10,5074)

Bei Vorgabe von  $\alpha = 0,1$  und  $\beta = 0,025$  für eine einseitige Fragestellung erhält man bei  $n = 10$  ein Verhältnis  $\sigma/d$  nahe 1. Bei diesem Verhältnis ist die Differenz zwischen Stichprobenmittelwert und Normwert genauso groß wie die Standardabweichung des Merkmals in der stoffwechselgesunden Population und entspricht der praktisch relevanten Differenz (Willer 1982). Oetzel (2004) empfiehlt bei Verwendung der NEFA und der BHB als Stichprobentestverfahrens auf Herdenebene und der Zielsetzung den Mittelwert einer Gruppe gegenüber einem Referenzwert zu beurteilen 8 bis 10 Proben.

Bei der Interpretation von gepoolten Proben oder der Betrachtung des Mittelwertes einer Stichprobe muss man bedenken, dass der Messwert den arithmetischen bzw. methodischen Mittelwert der Gruppe repräsentiert. Bei Annahme einer gleichmäßigen Verteilung und einer Stichprobengröße von  $n = 10$  befinden sich 5 Tiere über und 5 Tiere unter dem Mittel- bzw. Poolwert. Würde man den Referenzbereich des Einzeltieres zur Interpretation verwenden und der Pool- oder Mittelwert liegt knapp unterhalb der oberen Grenze, so würde das bedeuten, dass einige Tiere außerhalb des Referenzbereiches liegen. Daraus leitet sich die Forderung nach speziellen Referenzwerten für die Bewertung von gepoolten Proben und für Untersuchungen, die den arithmetischen Mittelwert verwenden, ab. Die Abweichung des Poolwertes bzw. Mittelwertes vom erwarteten Pool- bzw. Mittelwert ist dabei entweder das Resultat einer vermehrten Anzahl an Tieren mit gestörten Metabolitwerten oder resultiert aus wenigen Tieren mit sehr niedrigen oder hohen Werten. Das Letztere ist nicht erwünscht und erschwert die Interpretation.

Poolproben bieten den Vorteil eine Vielzahl von Laborparametern nutzbar zu machen und dabei die labordiagnostischen Kosten der Stoffwechselüberwachung zu reduzieren (van Saun 2007a).

Empfehlungen zur Anwendung von Stichprobentestverfahren der NEFA und der BHB und der Beurteilung des Mittel- oder Poolwertes der Stichprobe sind Tabelle 15 dargestellt.

Tabelle 14: Übersicht zu Grenzwerten der NEFA und der BHB im Serum/Plasma bei Milchkühen unter Anwendung als Stichprobentestverfahren und Beurteilung des Anteils an Tieren mit abnormen Werten innerhalb der Stichprobe

<b>Autor</b>	<b>Parameter</b>	<b>Grenzwert</b>	<b>n*</b>	<b>Kommentar</b>
Oetzel 2004	NEFA	0,4mmol/l	12	Störung, wenn >10% der Einzeltiere oberhalb des Grenzwertes; 2 - 14d a.p.
Fürll 2005	NEFA	0,62mmol/l	10	Störung, wenn >20% der Einzeltiere oberhalb des Grenzwertes; post partum
Fürll 2005	NEFA	0,1mmol/l	10	Störung, wenn >20% der Einzeltiere oberhalb des Grenzwertes; ante partum
Oetzel 2004	BHB	1,4mmol/l	12	Störung, wenn >10% der Einzeltiere oberhalb des Grenzwertes; 5 - 50d p.p.
Fürll 2005	BHB	0,62mmol/l	10	Störung, wenn >20% der Einzeltiere oberhalb des Grenzwertes

\* empfohlene/ verwendete Stichprobenanzahl

Tabelle 15: Übersicht zu Grenzwerten der NEFA und der BHB im Serum/Plasma bei Milchkühen unter Anwendung als Stichprobentestverfahren und Beurteilung des Mittel- oder Poolwertes

<b>Autor</b>	<b>Parameter</b>	<b>Grenzwert</b>	<b>n*</b>	<b>Kommentar</b>
van Saun 2007a	NEFA	0,51mmol/l	≥8	>20% Tiere mit abnormen Werten in der Stichprobe, wenn der Poolwert oberhalb des Grenzwertes
van Saun 2007a	NEFA	0,66mmol/l	≥8	>40% Tiere mit abnormen Werten in der Stichprobe, wenn der Poolwert oberhalb des Grenzwertes
Fürll 2005	NEFA	0,5mmol/l	10	Gesundheitsstörung, wenn Mittelwert oberhalb des Grenzwertes; post partum
Fürll 2005	NEFA	0,09mmol/l	10	Gesundheitsstörung, wenn Mittelwert oberhalb des Grenzwertes; ante partum
van Saun 2007a	BHB	1,0mmol/l	≥8	>20% Tiere mit abnormen Werten in der Stichprobe, wenn der Poolwert oberhalb des Grenzwertes
van Saun 2007a	BHB	1,3mmol/l	≥8	>40% Tiere mit abnormen Werten in der Stichprobe, wenn der Poolwert oberhalb des Grenzwertes
Fürll 2005	BHB	0,53mmol/l	10	Gesundheitsstörung, wenn Mittelwert oberhalb des Grenzwertes
Lehwenich 1999	BHB	0,99mmol/l	10	84%-Perzentil von 37 Poolwerten 3 bis 1 Woche ante partum
Lehwenich 1999	BHB	1,4mmol/l	10	84%-Perzentil von 37 Poolwerten 0 bis 1 Woche post partum
Lehwenich 1999	BHB	1,4mmol/l	10	84%-Perzentil von 37 Poolwerten 3 bis 5 Wochen post partum
Lehwenich 1999	BHB	1,2mmol/l	10	84%-Perzentil von 37 Poolwerten 15 bis 18 Wochen post partum

\* empfohlene/ verwendete Stichprobenanzahl

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Faktoren auf die labordiagnostischen Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind**

Dieser Versuch setzt sich aus 6 einzelnen Abschnitten zusammen (Tab. 16). Für jeden Abschnitt wurden jeweils 12 Milchkühe der Rasse Holstein Friesian beprobt. Die Auswahl der Tiere erfolgte zufällig, wobei sich die 12 Tiere eines jeweiligen Abschnittes entweder aus einem Betrieb oder mehreren Betrieben rekrutierten und sich in einem Zeitraum von 0-60d p.p. befanden.

In einem Vorversuch sollte geprüft werden, inwieweit die Tiefgefrierung einen Einfluss auf die Bestimmung der NEFA oder BHB hat. Dazu wurde das Serum nach der Zentrifugation bis zur Analyse entweder für 24 Stunden im Kühlschrank gelagert oder für 24 Stunden eingefroren.

Zur Untersuchung verschiedener Einflussfaktoren bei der Verwendung von Serum auf die Bestimmung der NEFA und der BHB wurde der Zeitpunkt der Zentrifugation (unmittelbar nach Gerinnung, 24h nach der Probenentnahme) und die Lagerungsbedingungen des Vollblutes (12h, 24h bei Raumtemperatur oder 1, 3, 5, 7d bei Lagerung im Kühlschrank) variiert. Weiterhin wurde der Einfluss verschiedener Antikoagulanzen (Heparin und EDTA) und der Einfluss des Blutentnahmeortes (Halsvene, Eutervene) untersucht.

Bei der Untersuchung des Einflusses eines Faktors wurden die Proben diesem Faktor ausgesetzt, anschließend eingefroren und später zusammen im Labor der Klinik der Klautiere der FU-Berlin analysiert. Es wurde jeweils der zu untersuchende Faktor mit dem Nullwert (Probenentnahme aus der Schwanzvene oder -arterie in ein Serum-Röhrchen, unmittelbare Zentrifugation nach der Probenentnahme und Gerinnung mit anschließender Tiefgefrierung des dekantierten Serums) verglichen. Die durchschnittliche Raumtemperatur lag bei 20°C, die durchschnittliche Kühlschranktemperatur bei 7°C und die durchschnittliche Temperatur beim Tiefgefrieren bei -20°C.

Tabelle 16: Versuchsablauf zum Einfluss präanalytischer Faktoren (n=12)

<b>Tiefgefrierung des Serums</b>						
Nullwert	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	24h KT	
A	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	24h TG	
<b>Lagerung des Serums bei Raumtemperatur (RT)</b>						
Nullwert	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	TG	
A	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	12h RT	▶ TG
B	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	24h RT	▶ TG
<b>Lagerung des Serums im Kühlschrank (KT)</b>						
Nullwert	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	TG	
A	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	1d KT	▶ TG
B	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	3d KT	▶ TG
C	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	5d KT	▶ TG
D	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	7d KT	▶ TG
<b>Antikoagulanz</b>						
Nullwert	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	TG	
A	BP-EDTA aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	TG	
B	BP-Heparin aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	TG	
<b>Ort der Blutprobenentnahme</b>						
Nullwert	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	TG	
A	BP-Serum aus V. jugularis ext.	▶	ZF	▶	TG	
B	BP-Serum aus V. epi. cran. spf.	▶	ZF	▶	TG	
<b>Lagerung des Vollblutes im Kühlschrank oder bei Raumtemperatur</b>						
Nullwert	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	ZF	▶	TG	
A	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	24h RT	▶	ZF	▶ TG
B	BP-Serum aus A./V. caudalis med.	▶	24h KT	▶	ZF	▶ TG
C	BP-EDTA aus A./V. caudalis med.	▶	24h RT	▶	ZF	▶ TG
D	BP-EDTA aus A./V. caudalis med.	▶	24h KT	▶	ZF	▶ TG
E	BP-Heparin aus A./V. caudalis med.	▶	24h RT	▶	ZF	▶ TG
F	BP-Heparin aus A./V. caudalis med.	▶	24h KT	▶	ZF	▶ TG

Abkürzungen: BP- Blutprobe; ZF – Zentrifugation; TG – Tiefgefrierung; RT – Raumtemperatur; KT - Kühlschranktemperatur

### 3.2. Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode

Zur Untersuchung der Tagesdynamik der NEFA und der BHB wurde ein Versuch in einem Milchviehbetrieb in Mecklenburg-Vorpommern durchgeführt. Der Betrieb hatte eine Herdendurchschnittsleistung von ungefähr 12000kg/Laktation bei einer Herdengröße von 1500 Tieren. Es wurden 6 Blutproben innerhalb von 20 Stunden von 10 trockenstehenden, pluriparen Holstein Friesian Kühen aus der Vorbereitergruppe in der letzten Woche ante partum und 7 Blutproben



innerhalb von 24 Stunden von 10 laktierenden, pluriparen Kühen aus der Früh-laktation genommen (Abb. 11). Die erste Probe wurde um 6 Uhr und die letzte um 2 Uhr (Vorbereiter) bzw. um 6 Uhr (Früh-laktation) am folgenden Tag genommen. Der Abstand zwischen den einzelnen Proben betrug vier Stunden. Die Probenentnahme erfolgte aus der Vena oder Arteria caudalis mediana. Die Fütterung erfolgte einmalig unter Vorlage einer TMR-Ration um 11 Uhr (Vorbereiter) bzw. 10:30 Uhr (Früh-laktation). Die laktierenden Kühe wurden um 7:45 Uhr, 14:45 Uhr und um 23:45 Uhr gemolken. Das Blut wurde in 9ml-Röhrchen ohne Antikoagulanzen zur Serumgewinnung aufgefangen. Nach vollständiger Gerinnung bei Raumtemperatur wurden die Proben vor Ort zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Auffangröhrchen dekantiert und anschließend eingefroren.

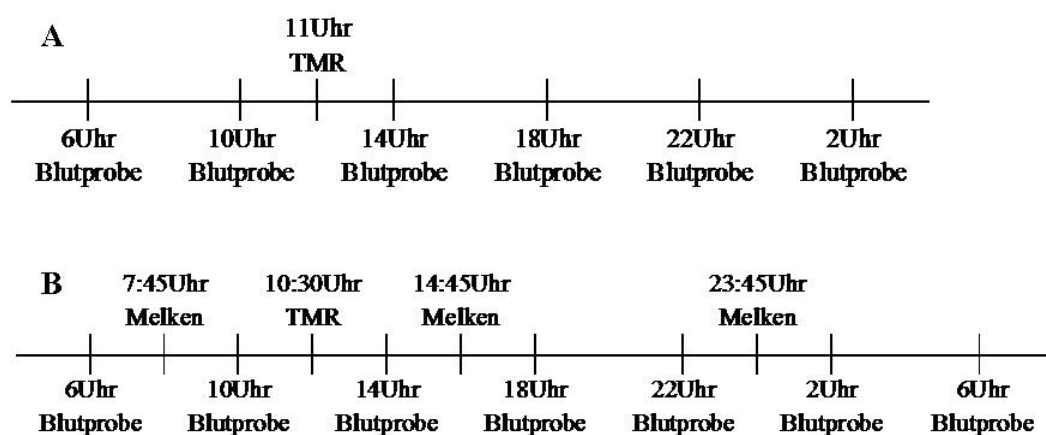


Abbildung 11: Schematische Darstellung zum Versuchsablauf Tagesdynamik für 10 Kühe aus der Vorbereitergruppe (A) und 10 Kühe aus der Früh-laktation (B)

### 3.3. Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode

Das Material für diesen Versuchsabschnitt stammte aus der Arbeit von Zechner (2009). Diese Untersuchungen wurden im Jahr 2008 in einer Milchviehanlage in Thüringen durchgeführt (Zechner 2009). Die Milchleistung in dem Betrieb lag 2005 im Jahresmittel bei 9500 kg Milch/Kuh. Es wurden 46 pluripare Kühe der Rasse „Schwarzbuntes Milchrind“ mit Einkreuzung „Holstein-Friesian“ erfasst und beprobt. Dabei wurden 16 Blutproben im peripartalen Zeitraum entnommen. Ante partum wurden 7 Proben jeweils im Abstand von drei Tagen (erste Probe im Bereich von 21-19d a.p.) entnommen (Abb. 12). Im Anschluss daran wurde eine Probe zum Partus und 8 Proben post partum an den Zeitpunkten 6h, 12h, 24h, 2d, 3d, 5d, 7d und 10d relativ zur Kalbung entnommen. Die Probenentnahme erfolgte aus der Vena oder Arteria caudalis mediana. Das Blut wurde in 10 ml-Röhrchen mit Lithium-Heparin als Antikoagulanzen aufgefangen. Im Anschluss wurden die Proben für 10min bei 5340 U/min (3800g) zentrifugiert. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße abpipettiert und anschließend eingefroren.

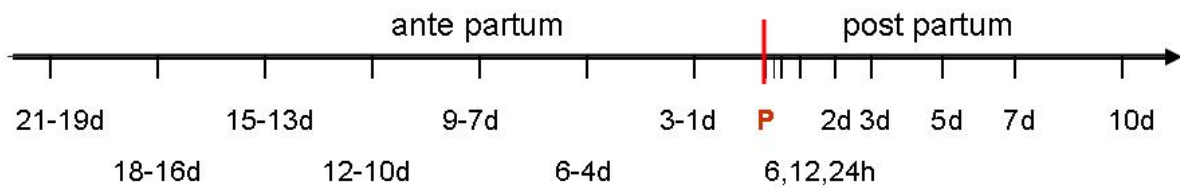


Abbildung 12: Schematische Darstellung zum Versuchsablauf der Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode

### 3.4. Untersuchung der Poolproben

Zur Auswertung wurden 278 Stoffwechseluntersuchungen genutzt, welche im Rahmen der Bestandsbetreuung der Klinik für Kleintiere der FU-Berlin erhoben wurden (Tab. 17). Die Untersuchungen wurden in der Zeit vom November 2005 bis März 2009 durchgeführt.

Tabelle 17: Übersicht der untersuchten Betriebe

Kennzahlen	n	Minimum	Maximum	Mittelwert	Standardabweichung
Herdengröße Milchkühe	256	107	2550	476	395,2
durchschnittliche Jahresmilchleistung im Betrieb in kg	247	6000	11800	9066	971,7
Remontierungsrate in %	225	15	51	35	5,9
Zellzahl im Bestand x1000	245	140	593	268	73,3
Zwischenkalbezeit in d	236	379	516	411	16,4
Rastzeit in d	229	56	189	82	13,6
Zwischentragezeit in d	222	86	204	132	16,3

Dabei wurden maximal 10 Blutproben von klinisch gesunden Kühen der ersten Laktationswoche entnommen. Die Blutentnahme erfolgte aus der Arteria oder Vena caudalis mediana. Das Blut wurde in 9 ml-Röhrchen ohne Antikoagulanzen zur Serumgewinnung aufgefangen. Die Proben wurden ca. vier bis sechs Stunden nach der Gewinnung im Labor der Klinik für Kleintiere der FU-Berlin aufbereitet. Für die Dauer des Transportes wurden die Blutproben in Kühltaschen bei 4 bis 10°C aufbewahrt. Zur Serumgewinnung wurden die Proben im Labor für 15 Minuten bei 4000U/min (3000g) zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und bildete die Grundlage für die Einzelproben und die Poolprobe der Stichprobe. Die Poolprobe wurde aus aliquoten Mengen der Einzelproben hergestellt (Abb. 13). Die Einzel- und Poolproben wurden bis zur Untersuchung am nächsten Tag bei 4 bis 8°C im Kühlschrank gelagert.

Aus den Einzelproben wurde der arithmetische Mittelwert der Stichprobe berechnet.

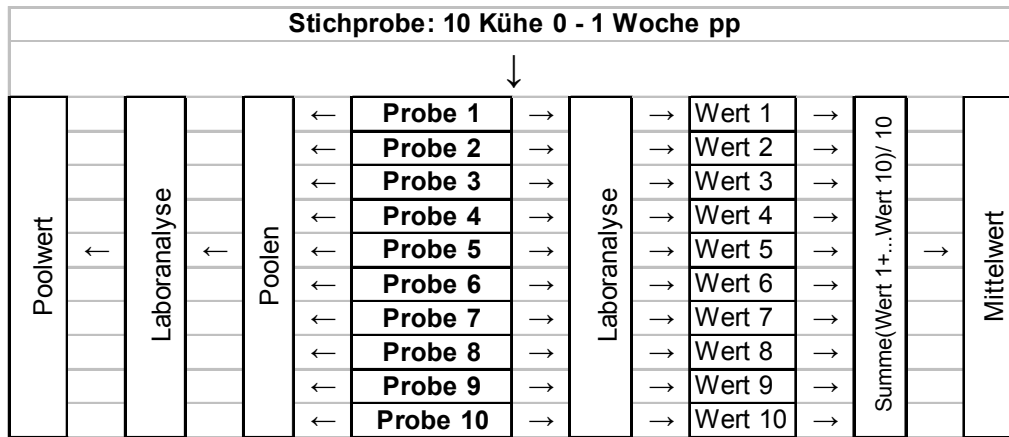


Abbildung 13: Schematische Darstellung zur Herstellung der Poolproben und des Mittelwertes einer Stichprobe bei  $n = 10$

### 3.5. Bestimmungsmethoden in den Versuchen

Die Laboranalysen aus dem Serum oder Plasma wurden unter Verwendung eines automatischen Analysegerätes (Cobas-Mira®, Hoffmann La-Roche, Schweiz) im Labor der Klinik für Klauentiere der FU-Berlin durchgeführt. Zur Bestimmung der NEFA und der BHB wurden die Reagenzien der Firma RANDOX (RANDOX Laboratories Ltd., United Kingdom) verwendet. Die Charge der Reagenzien war in allen Versuchen gleich.

Die Bestimmung der NEFA erfolgte nach der kolorimetrischen Methode. Die NEFA reagieren unter Katalyse der Acyl-CoA-Synthetase zusammen mit Adenosintriphosphat und Co-Enzym A zu Acyl-CoA, Adenosinmonophosphat und Phosphat. Das Acyl-CoA reagiert unter Anwesenheit von Sauerstoff unter Katalyse der Acyl-CoA-Oxidase zu 2,3-Trans-Enoyl-CoA und Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid reagiert letztendlich unter Katalyse der Peroxidase zu einem purpurnen Farbstoff. Die Menge dieses Farbstoffes ist proportional zur Menge der NEFA und wird optisch gemessen.

Die Bestimmung der BHB erfolgte nach der enzymatisch-kinetischen Methode. Das D-3-Hydroxybutyrat wird durch die BHB-Dehydrogenase zu Acetoacetat umgewandelt. Gleichzeitig wird der Co-Faktor  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  reduziert. Die Zunahme von  $\text{NADH}$  wird optisch gemessen und ist proportional zur Menge an BHB.

Zur Beschreibung der Präzision der Bestimmungsmethode wurde der Variationskoeffizient einer Mehrfachbestimmung der NEFA und der BHB an einem Tag (Intra-day-Variationskoeffizient) und an aufeinander folgenden Tagen (Inter-day-Variationskoeffizient) ermittelt (Tab. 18).

Der Variationskoeffizient (VK) wird nach folgender Formel berechnet:

$$VK = \frac{\text{Standardabweichung} \times 100}{\text{Mittelwert}}$$

Tabelle 18: Präzision der Bestimmungsmethoden

Parameter	Intra-day-VK (n=10) VK in %	Inter-day-VK (n=8) VK in %
NEFA-Serum	2,98	8,94
NEFA-EDTA-Plasma	2,45	11,99
NEFA-Heparin-Plasma	2,65	7,73
BHB-Serum	2,81	4,90
BHB-EDTA-Plasma	2,89	4,68
BHB-Heparin-Plasma	2,95	3,56

In der Tabelle 19 sind die verwendeten Materialien für die Versuche aufgelistet.

Tabelle 19: Materialien zur Untersuchung der präanalytischen Einflussfaktoren (1), der Tagesdynamik (2), der Dynamik in der Transitperiode (3) und der Poolproben (4)

Material	Beschreibung (Hersteller)	Verwendung in Versuch
Serum-Monovetten	9,0ml (Sarstedt)	1,2,4
Röhrchen mit EDTA	10ml (Sarstedt)	1
Röhrchen mit Lithium-Heparin	10ml (KABE)	1,3
Auffangröhrchen	5ml mit Deckel verschließbar (Sarstedt)	1,2
Eppendorfgefäße	2ml (Kisker GbR)	3
Zentrifuge 1	Labofuge 200 (Heraeus)	1,2,4
Zentrifuge 2	EBA 12 (Hettich Tuttlingen)	3

### 3.6. Biostatistische Auswertung

Die Dateneingabe erfolgte unter Verwendung von MS Excel (Microsoft® Office Excel 2003, USA). Die statischen Auswertungen wurden mit Hilfe von SPSS 16.0 (SPSS Inc., USA), BiAS 8.2 (epsilon-Verlag, Deutschland) und MedCalc 10.3.2.0 (MedCalc Software, Belgien) durchgeführt. Das Signifikanzniveau war mit  $\alpha = 5\%$  ( $p < 0,05$ ) festgelegt.

#### 3.6.1. Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Variablen auf die labordiagnostischen Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind

Zur Beurteilung des Einflusses der verschiedenen präanalytischen Faktoren wurde der Bland-Altman-Methodenvergleich verwendet.

Der Bland-Altman-Methodenvergleich dient zum Vergleich einer Referenzmethode mit einer Alternativmethode. Er ist ein einfaches Verfahren, das die Verzerrung und die Streuung der Daten berücksichtigt und mit dessen Hilfe systematische Abweichungen, Ausreißer sowie Abhängigkeiten der Varianz von der Größe der Messwerte beurteilt werden können (Bland und Altman 1986). Die

Referenzmethode ist der Nullwert und die Alternativmethode stellen die unterschiedlichen präanalytischen Einflussfaktoren dar. Es erfolgte eine grafische Auswertung, wobei auf der Abszisse der Mittelwert von Nullwert und dem Einflussfaktor ( $X = [\text{Nullwert} + \text{Einflussfaktor}]/2$ ) dargestellt wird. Der Mittelwert der beiden Messergebnisse stellte dabei die bestmögliche Schätzung des unbekannt wahren Wertes dar. Auf der Ordinate wird die absolute Differenz zwischen dem Nullwert und dem Einflussfaktor ( $Y = \text{Nullwert} - \text{Einflussfaktor}$ ) aufgetragen. In der Grafik steht die fette horizontale Linie für den Durchschnitt der Differenzen der Methoden (mean), die dünne horizontale gestrichelte Linie (...) für die optimale Null-Linie bei Übereinstimmung, die dünne gestrichelte Linie für die Regression "Differenz auf Durchschnitt" ( \_ \_ ) und die gestrichelte Linie ( \_ \_ ) ober- und unterhalb der durchschnittlichen Differenz für die Übereinstimmungsgrenzen ( $+1,96 \times \text{SD}$  bzw.  $-1,96 \times \text{SD}$ ).

Bei einer hinreichend symmetrischen Verteilung der Differenzen liegen 95% der Werte im Bereich  $D \pm 1,96 \times \text{Standardabweichung}$ . Diese Grenzen werden als Übereinstimmungsgrenzen bezeichnet. Die klinische Beurteilung dieser Grenzen ermöglicht eine Einschätzung der Übereinstimmungsgüte zwischen den Methoden (Grouven et al. 2007).

Die Ergebnisse wurden tabellarisch unter Angabe des Mittelwertes der Methoden, der mittleren Differenz zwischen den Methoden, der Standardabweichung der Differenz, der absoluten Übereinstimmungsgrenzen (Differenz  $\pm 1,96 \times \text{Standardabweichung}$ ), des Regressionskoeffizienten (b) und der Korrelation (r) zusammengefasst. Der Regressionskoeffizient und die Korrelation beschreiben den Zusammenhang zwischen dem Durchschnitt der beiden Methoden und der Differenz der beiden Methoden.

### **3.6.2. Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode**

Zur Untersuchung des Einflusses der Tageszeit auf die Bestimmung der NEFA und der BHB wurde eine univariate Varianzanalyse verwendet. Als abhängige Variable wurden entweder die NEFA oder die BHB eingesetzt. Fester Faktor war die Tageszeit und zufälliger Faktor war das Tier. Es wurden nur die Haupteffekte Tageszeit und Tier untersucht. Zur besonderen Betrachtung des Einflusses der Futtervorlage wurden die Messzeitpunkte untereinander mit dem posthoc-Test nach Sidak verglichen. Das  $\alpha$  wurde entsprechend der Anzahl an paarweisen Vergleichen adjustiert.

Die Tagesprofile der NEFA und der BHB werden als Liniendiagramm dargestellt.

### **3.6.3. Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode**

Zur Untersuchung des Einfluss des Laktationszeitpunktes auf die Bestimmung der NEFA und der BHB wurde eine univariate Varianzanalyse verwendet. Als abhängige Variable wurden entweder die NEFA oder die BHB eingesetzt. Fester Faktor war die Zeit relativ zur Kalbung und zufälliger Faktor

war das Tier. Es wurden nur die Haupteffekte Zeit relativ zur Kalbung und Tier untersucht. Die Untersuchungszeiträume waren der gesamte, der antepartale und der postpartale Versuchszeitraum. Zur Ermittlung der mittleren Differenzen zwischen den einzelnen Laktationszeitpunkten wurde der posthoc-Test nach Sidak durchgeführt. Das  $\alpha$  wurde entsprechend der Anzahl an paarweisen Vergleichen adjustiert.

Die Konzentration der NEFA und der BHB wird zu den 16 Messzeitpunkten als Box- und Whiskerplot dargestellt. Die Whisker entsprechen dem größten und kleinsten Wert, sofern sie keine Ausreißer oder Extremwerte sind. Die Box wird durch das 25. und 75. Perzentil begrenzt. Die Linie in der Box entspricht dem Median und die Boxenlänge entspricht dem Interquantilbereich. Extremwerte werden mit einem Quadrat markiert (■) und liegen mehr als drei Boxenlängen außerhalb. Ausreißer werden durch einen Kreis markiert (○) und liegen mehr als anderthalb Boxenlängen außerhalb.

### **3.6.4. Untersuchung der Poolproben**

#### **3.6.4.1. Deskriptive Statistik der Einzel-, Mittel und Poolwerte**

Es wurden die Minimum- (Min) und Maximumwerte (Max), der Mittelwert, die Standardabweichung, der Variationskoeffizient, der Median, das erste und dritte Quartil und der Quartilsabstand berechnet. Zur grafischen Darstellung der Verteilung der Einzel- und Poolwerte wurde ein Histogramm mit der relativen Häufigkeit gewählt.

Zusätzlich wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung getestet.

Die Berechnung der Korrelation erfolgte mit der Produkt-Moment-Korrelation bei normalverteilten Stichproben nach Pearson und bei nicht-normalverteilten mit der Rangkorrelation nach Spearman.

#### **3.6.4.2. Vergleich von Mittel- und Poolwerten**

Der Methodenvergleich zwischen dem arithmetischen Mittelwert und dem Poolwert erfolgte unter Anwendung der linearen Regression und des Bland-Altman-Methodenvergleiches.

Die Darstellung der linearen Regressionsanalyse erfolgte grafisch in einem Scatterplot mit der Angabe der Gleichung der Regressionsgeraden ( $y_i = a + bx_i + E_i$ ) und dem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ). Hiernach gelten Mittel- und Poolwert in ihrem Informationsgehalt als gleichbedeutend, wenn das 95%-Konfidenzintervall der Regressionsgeraden die Idealgerade  $y = x$  umschließt und eine hohe bis sehr hohe Korrelation ( $r > 0,9$ ) vorliegt.

Die Anwendung des Bland-Altman-Methodenvergleiches erfolgt analog dem Abschnitt 3.2.1.

Die Referenzmethode ist der Mittelwert (MW) und die Alternativmethode der Poolwert (Pool). Auf der Abszisse wird der Mittelwert von Mittelwert und Poolwert ( $X = [MW + Pool]/2$ ) dargestellt. Die

Darstellung auf der Ordinate ist abhängig von der Spannweite der Abszisse (Dewitte et al. 2002). Bei geringer Spannweite sollte die absolute Differenz, bei mittlerer Spannweite die relative Differenz und bei großer Spannweite die logarithmisch-skalierte Differenz verwendet werden. Auf der Ordinate wird hier zum einen die absolute Differenz von Mittelwert und Poolwert ( $Y = MW - Pool$ ) und zum anderen die relative Differenz bezogen auf den Durchschnitt ( $Y = [MW - Pool]/\text{Durchschnitt} \times 100$ ) aufgetragen.

Die Ergebnisse wurden tabellarisch unter Angabe des Mittelwertes der Methoden, der mittleren Differenz zwischen den Methoden, der Standardabweichung der Differenz, der absoluten Übereinstimmungsgrenzen (Differenz  $\pm 1,96 \times$  Standardabweichung), des Regressionskoeffizienten (b) und der Korrelation (r) zusammengefasst. Der Regressionskoeffizient und die Korrelation beschreiben den Zusammenhang zwischen dem Durchschnitt der beiden Methoden und der Differenz der beiden Methoden.

### **3.6.4.3. Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und der Anzahl an Tieren über dem Referenzwert in der Stichprobe**

Zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen dem Poolwert der Stichprobe und der Anzahl an Tieren über dem Referenzwert in der Stichprobe wurde die lineare Regressionsanalyse ( $y_i = a + bx_i + E_i$ ) gewählt. Es erfolgte eine tabellarische Darstellung der Regressionsanalyse für die einzelnen Referenzwerte. Die abhängige Variable ( $y_i$ ) ist hier der Poolwert der Stichprobe und die unabhängige Variable ( $x_i$ ) ist die Anzahl an Tieren über dem Referenzwert in der Stichprobe.

### **3.6.4.4. Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten und größten Einzelwert in der Stichprobe**

Zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen dem Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten und größten Einzelwert in der Stichprobe wurde die multiple Regressionsanalyse ( $y_i = a + b_1X_{i1} + b_2X_{i2} + \dots + b_nX_{in} + E_i$ ) gewählt. Die abhängige Variable ( $y_i$ ) ist der Poolwert und die unabhängigen Variablen sind der kleinste (Min) und der größte (Max) Einzelwert in der Stichprobe. Es erfolgte eine tabellarische Darstellung der Regressionsanalyse.  $\beta$  beschreibt hier den standardisierten Regressionskoeffizienten und b den nicht-standardisierten Regressionskoeffizienten.  $sr^2$  ist das Quadrat der semipartiellen Korrelation und ist ein Maß für die Varianz der abhängigen Variable, welche durch eine der unabhängigen Variablen im Regressionsmodell erklärt wird.

### 3.6.4.5. Ermittlung von Referenzwerten für gepoolte Serumproben der NEFA und der BHB

Zur Ermittlung der Referenzwerte in dieser Untersuchung sind zwei Verfahren zur Definition der Referenzpopulationen zu unterscheiden. Ausgehend von der Referenzpopulation wurden Referenzwerte an Hand von parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen definiert.

Zusätzlich wurden Referenzwerte durch die Verwendung der ROC-Kurvenanalyse (Receiver Operating Characteristic) berechnet.

#### 3.6.4.5.1. Definition einer Referenzpopulation an Hand des Anteils an gestörten Tieren in der Stichprobe

Die Definition der Referenzpopulation erfolgte hier durch Zuordnung der Herden in drei Kategorien: gesund, verdächtig und gestört. Die Trennung zwischen gesunden, verdächtigen und gestörten Herden erfolgte an Hand des Anteils an Einzeltieren über einem Referenzwert, welche sich in der Stichprobe befanden (Oetzel 2004). Die Referenzwerte wurden aus der Literatur entnommen. In einer gesunden Herde befand sich kein Tier mit einer NEFA- oder BHB-Konzentration im Serum über dem jeweiligen Einzeltierreferenzwert. In einer verdächtigen Herde waren es ein bis zwei Tiere und in einer gestörten Herde mehr als zwei Tiere. Die gesunden Herden dienten als Referenzpopulation.

#### 3.6.4.5.2. Definition einer Referenzpopulation an Hand der Schiefe der Verteilungsfunktion der Poolproben

Die Definition der Referenzpopulation erfolgte hier durch Extraktion einer Poolpopulation an Hand der Schiefe der Verteilungsfunktion. Dazu wurden die Poolwerte ihrer Größe nach geordnet und die Schiefe (Abb. 14) für die Verteilungsfunktion aller Poolwerte aus der Population berechnet.

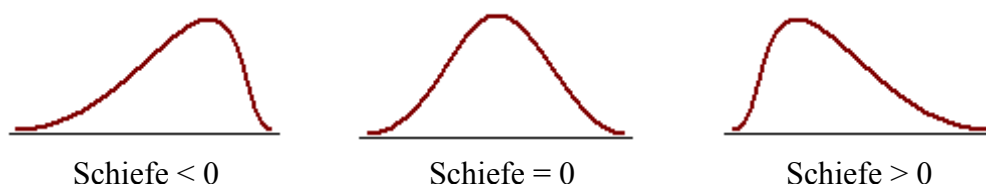


Abbildung 14: Schiefe einer Verteilungsfunktion

Anschließend wurde die Population der Poolwerte sukzessive um 1 verringert (Absenken des maximalen Poolwertes) und von dieser Population  $n-1$  erneut die Schiefe und Kurtosis berechnet. Dies



wurde solange fortgeführt bis die Verteilungsfunktion eine Schiefe aufwies, die der Normalverteilung (Schiefe = 0) entsprach. Diese Poolpopulation wurde extrahiert und diente dann als Referenzpopulation.

### **3.6.4.5.3. Anwendung von parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen zur Berechnung von Referenzwerten**

Bei den parametrischen Verfahren wurde die Formel  $\bar{x} \pm k \times s$  verwandt. Für den Faktor k wurden folgende Ausprägungen angenommen:  $k = 1$  (68,26% der Werte liegen in diesem Bereich  $\bar{x} \pm 1 \times s$ ) und  $k = 1,96$  (95% der Werte liegen in diesem Bereich  $\bar{x} \pm 1,96 \times s$ ).

Dazu wurden die entsprechenden nicht-parametrischen Streuungsmaße angegeben. Bei  $k = 1$  entsprechen diese dem 16%- und 84%-Perzentil und bei  $k = 1,96$  entsprechen diese dem 2,5%- und 97,5%-Perzentil.

### **3.6.4.5.4. Anwendung der ROC-Kurvenanalyse zur Berechnung von Referenzwerten**

Die Anwendung der ROC-Kurvenanalyse ist nur möglich, wenn die zwei zu trennenden Populationen sich in einem Merkmal (z.B. gesund und krank) unterscheiden. Dieses Merkmal entspricht hier der Einteilung der Herden in gesund, verdächtig und gestört. Die ROC-Kurvenanalyse ist ein grafisches Verfahren, um die diagnostischen Eigenschaften eines Tests zur Trennung zwischen zwei Populationen zu bewerten. Es dient der Ermittlung eines Grenzwertes, welcher die besten diagnostischen Eigenschaften besitzt.

Man ermittelt für jeden möglichen Grenzwert die resultierenden relativen Häufigkeitsverteilungen und errechnet das jeweils zugehörige Wertepaar aus Sensitivität und Spezifität. In einem Diagramm mit der Ordinate Sensitivität (= relative Häufigkeit aller richtig positiven/true positive bzw. "TP" Testergebnisse) und der Abszisse 1- Spezifität (= relative Häufigkeit aller falsch positiven bzw. "FP" Testergebnisse) trägt man die obigen Wertepaare ein (Abb. 15 und 16). Ein Test mit perfekter Trennung zwischen gesunder und kranker Population besitzt eine ROC-Kurve, die durch die obere linke Ecke (100% Sensitivität, 100% Spezifität) verläuft. Je näher die ROC-Kurve an der oberen linken, umso besser ist die Gesamteigenschaft des Testes (Greiner et al. 2000).

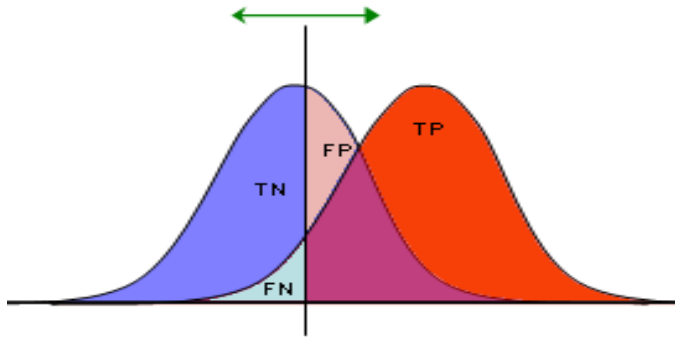


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der TN (true-negative), FN (false-negative), TP (true-positive) und FP (false-positive) in einer gesunden und kranken Population

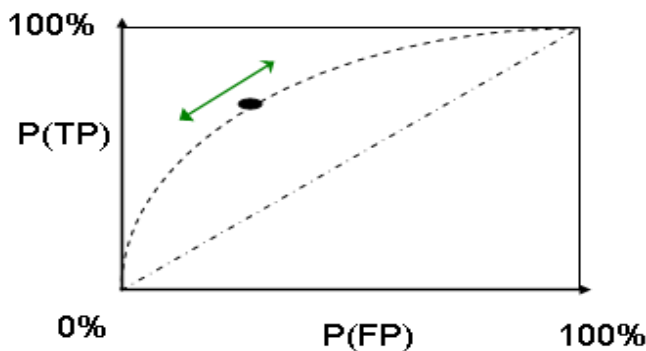


Abbildung 16: Beispiel einer ROC-Kurve (P(TP) true-positive bzw. Sensitivität; P(FP) false-positive bzw. 100-Spezifität)

Die Ergebnisse der ROC-Kurvenanalyse wurden tabellarisch zusammengefasst mit der jeweiligen Anzahl und Definition der Herden (gesund, verdächtig, gestört), der Fläche unter der ROC-Kurve (AUC), dem empfohlenen Cutpoint, dem prozentualen Anteil der Herden über dem Cutpoint, der Sensitivität (Se) und der Spezifität (Sp). Der empfohlene Cutpoint besitzt die besten diagnostischen Eigenschaften (maximale Summe aus Sensitivität und Spezifität).

Die prädiktiven Werte sind abhängig von der Prävalenz (Präv) der Erkrankung, der Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp) eines Tests. Sie werden nach folgender Formel berechnet (Farver 2008):

$$\text{Positiver Prädiktiver Wert (PV+)} = \frac{\text{Präv} \times \text{Se}}{(\text{Präv} \times \text{Se}) + (1 - \text{Präv}) \times (1 - \text{Sp})}$$

$$\text{Negativer Prädiktiver Wert (PV-)} = \frac{(1 - \text{Präv}) \times \text{Sp}}{(1 - \text{Präv}) \times \text{Sp} + \text{Präv} \times (1 - \text{Se})}$$

Die prädiktiven Werte werden in Abhängigkeit von der Prävalenz für ausgewählte Cutpoints dargestellt.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Variablen auf die labordiagnostischen Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind

Bei der Untersuchung des Einflusses präanalytischer Variablen auf die Bestimmung der NEFA und der BHB wurde ein Ausgangswert (Nullwert) mit dem Einfluss eines Faktors verglichen. Hierbei wurden die mittlere Differenz (D) und die Übereinstimmungsgrenzen ( $D \pm 1,96 \times s$ ) berechnet. Die Übereinstimmungsgrenzen können wie folgt interpretiert werden: in 95% der Fälle liegt die Abweichung (Differenz) unter den Bedingungen des Einflussfaktors in dem Bereich zwischen unterer und oberer Übereinstimmungsgrenze. In ausgewählten Fällen wird der Bland-Altman-Methodenvergleich abgebildet.

#### 4.1.1. Einfluss der Tiefgefrierung des Serums für 24 Stunden auf die Bestimmung der NEFA und der BHB

Die Ergebnisse zum Einfluss der Tiefgefrierung des Serums für 24h auf die Bestimmung der NEFA und der BHB sind in Tabelle 20 und den Abbildungen 17 und 18 zusammengefasst.

Tabelle 20: Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Tiefgefrierung (TG, -20°C) des Serums für 24h gegenüber dem Nullwert

	Mittelwert mmol/l	Differenz <sup>1</sup> mmol/l	p	s	Übereinstimmungsgrenzen		b	r
					oben	unten		
<b>Nullwert</b>	<b>0,41</b>							
NEFA TG	0,38	<b>0,04</b>	0,01	0,03	0,10	-0,02	-0,01	n.s. -0,1
<b>Nullwert</b>	<b>0,65</b>							
BHB TG	0,63	<b>0,02</b>	0,03	0,03	0,07	-0,04	-0,01	n.s. -0,1

<sup>1</sup> fett – p < 0,05

Es besteht eine signifikante Differenz für die NEFA und die BHB gegenüber dem Nullwert bei Tiefgefrierung der Proben.

Zum besseren Verständnis soll hier einmal der Bland-Altman-Methodenvergleich in Abbildung 17 ausführlicher beschrieben werden. „Mean“ (0,037mmol NEFA/l) bezeichnet die mittlere Differenz zwischen der NEFA-Konzentration nach Lagerung im Kühlschrank (NEFA\_Nullwert) und der NEFA-Konzentration nach Tiefgefrierung (NEFA\_TG). „+1.96 SD“ (0,097mmol NEFA/l) bezeichnet die obere Übereinstimmungsgrenze und „-1.96 SD“ (-0,023mmol NEFA/l) die untere Übereinstimmungsgrenze. Die tiefgefrorenen Serumproben der NEFA sind also um 0,04mmol/l

geringer gegenüber den gekühlten Proben der NEFA. Die Standardabweichung von 0,03mmol NEFA/l ist gering und verbunden mit engen Übereinstimmungsgrenzen (0,10 und -0,02mmol NEFA/l).

Die Regressionsgerade (—) verdeutlicht, dass es keinen signifikanten Zusammenhang gibt zwischen der Differenz und dem Durchschnitt der Methoden. Es liegt eine zufällige Verteilung um die mittlere Differenz vor.

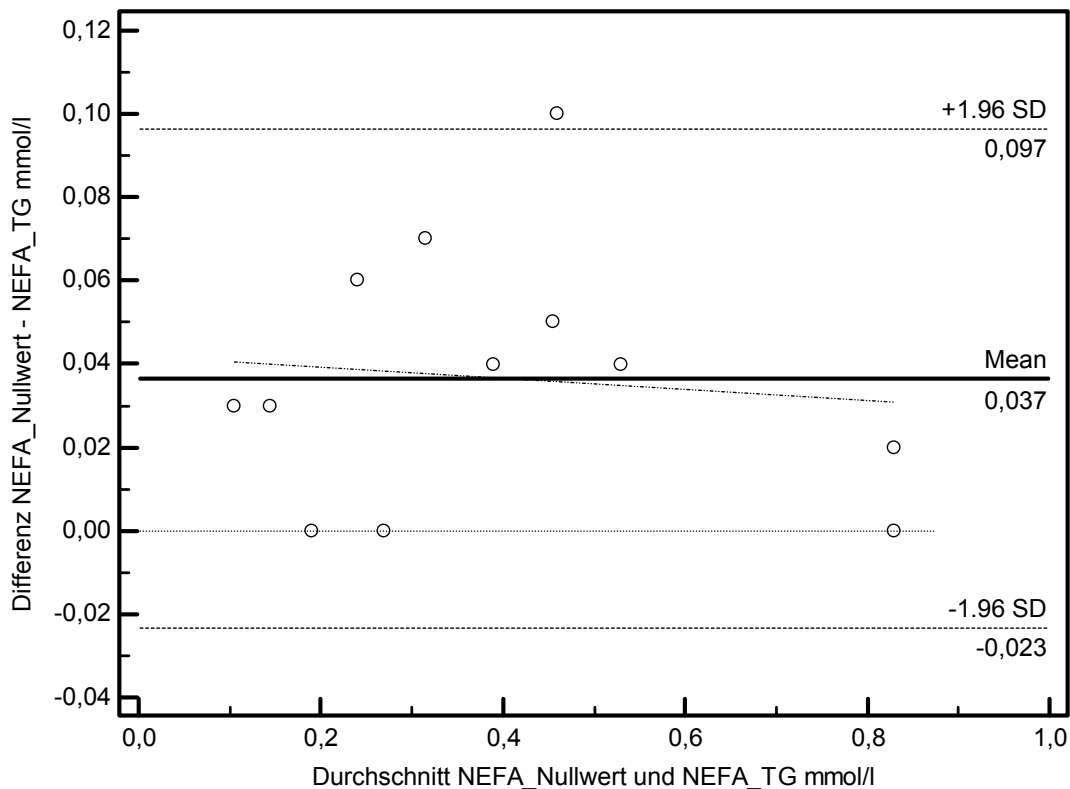


Abbildung 17: Bland-Altman-Methodenvergleich für die NEFA zwischen dem Nullwert und der Tiefgefrierung (NEFA\_TG) der Proben (n=12)

Die tiefgefrorenen Serumproben der BHB sind um 0,02mmol/l geringer gegenüber dem Nullwert (Abb. 18). Die Übereinstimmungsgrenzen sind eng. Es liegt eine zufällige Verteilung um die mittlere Differenz vor.

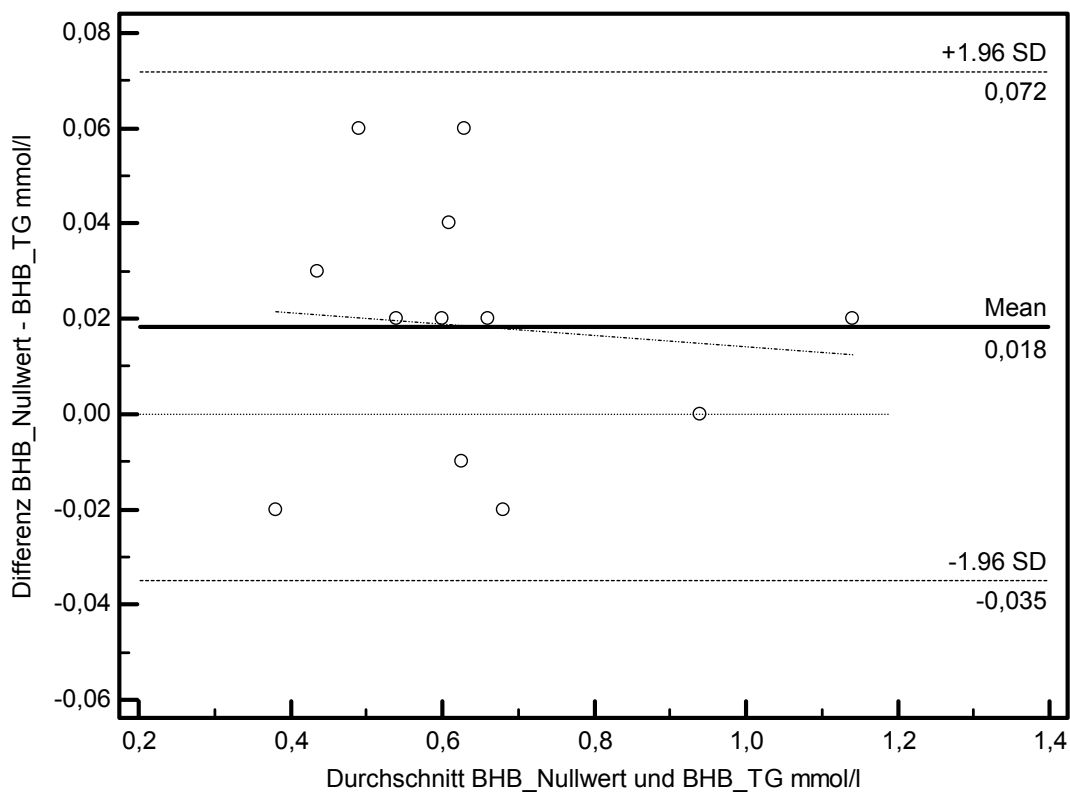


Abbildung 18: Bland-Altman-Methodenvergleich für die BHB zwischen dem Nullwert und der Tiefgefrierung (BHB\_TG) der Proben (n=12)

#### 4.1.2. Einfluss der Lagerung des Serums für 12 und 24 Stunden bei Raumtemperatur auf die Bestimmung der NEFA und der BHB

Die Ergebnisse zum Einfluss der Lagerung des Serums bei Raumtemperatur für 12h und 24h auf die Bestimmung der NEFA und der BHB sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21: Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Lagerung des Serums bei Raumtemperatur (+20°C) für 12h und 24h gegenüber dem Nullwert

	Mittelwert mmol/l	Differenz mmol/l	p	s	Übereinstimmungsgrenzen		b	r
					oben	unten		
<b>Nullwert</b>	<b>0,21</b>							
NEFA 12h	0,22	-0,01	0,70	0,05	0,10	-0,11	-0,02	n.s. -0,06
NEFA 24h	0,22	-0,01	0,55	0,06	0,10	-0,12	-0,04	n.s. -0,11
<b>Nullwert</b>	<b>0,66</b>							
BHB 12h	0,68	-0,02	0,38	0,07	0,11	-0,15	-0,12	n.s. -0,33
BHB 24h	0,66	0,00	0,95	0,05	0,10	-0,10	-0,05	n.s. -0,17

Die mittlere Differenz der Serumproben, die für 12h oder 24h bei Raumtemperatur gelagert wurden, unterscheidet sich für beide Parameter nicht signifikant vom Nullwert. Die Übereinstimmungsgrenzen sind eng und es existiert kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Wertebereich und der Ausprägung der Differenz.

#### 4.1.3. Einfluss der Lagerung des Serums im Kühlschrank für 1, 3, 5 und 7 Tage auf die Bestimmung der NEFA und der BHB

Die Ergebnisse zum Einfluss der Lagerung des Serums im Kühlschrank für 1,3,5, und 7d auf die Bestimmung der NEFA und der BHB sind in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22: Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Lagerung des Serums im Kühlschrank (+7°C) für 1,3,5 und 7d gegenüber dem Nullwert

	Mittelwert mmol/l	Differenz <sup>1</sup> mmol/l	p	s	Übereinstimmungsgrenzen		b <sup>1</sup>	r <sup>1</sup>
					oben	unten		
<b>Nullwert</b>	<b>0,51</b>							
NEFA 1d	0,49	0,02	0,30	0,07	0,16	-0,11	0,04 <i>n.s.</i>	0,18
NEFA 3d	0,50	0,01	0,37	0,05	0,11	-0,10	-0,02 <i>n.s.</i>	-0,12
NEFA 5d	0,51	0,00	0,88	0,05	0,11	-0,11	0,01 <i>n.s.</i>	0,03
NEFA 7d	0,55	-0,04	0,11	0,08	0,12	-0,20	-0,07 <i>n.s.</i>	-0,28
<b>Nullwert</b>	<b>0,54</b>							
BHB 1d	0,59	<b>-0,05</b>	0,01	0,06	0,07	-0,17	<i>-0,15</i> <i>p &lt; 0,1</i>	<i>0,54</i>
BHB 3d	0,55	-0,01	0,31	0,03	0,05	-0,07	-0,01 <i>n.s.</i>	-0,03
BHB 5d	0,55	-0,01	0,52	0,03	0,06	-0,07	0,01 <i>n.s.</i>	0,08
BHB 7d	0,59	<b>-0,05</b>	0,01	0,02	-0,02	-0,09	0,02 <i>n.s.</i>	0,20

<sup>1</sup> **fett** –  $p < 0,05$ ; *kursiv* –  $p < 0,1$

Die mittlere Differenz der Serumproben unterscheidet sich bei Lagerung im Kühlschrank für die BHB nur zum Zeitpunkt 1d und 7d signifikant gegenüber dem Nullwert.

Bei Lagerung des Serums im Kühlschrank unterscheiden sich die NEFA zu keinem Zeitpunkt signifikant gegenüber dem Nullwert. Die Übereinstimmungsgrenzen sind über die gesamte Lagerungsdauer ausreichend eng.

Die BHB-Konzentration ist bei ein- bzw. siebentägiger Lagerung des Serums im Kühlschrank nur geringfügig höher gegenüber dem Nullwert. Die Übereinstimmungsgrenzen sind über die gesamte Lagerungsdauer ausreichend eng. Bei eintägiger Lagerung des Serums im Kühlschrank besteht ein geringfügiger negativer Zusammenhang ( $p < 0,1$ ) zwischen der Differenz der Methoden und dem Wertebereich.

#### 4.1.4. Einfluss des Antikoagulanzen auf die Bestimmung der NEFA und der BHB

Die Ergebnisse zum Einfluss der Antikoagulanzen EDTA und Heparin auf die Bestimmung der NEFA und der BHB sind in Tabelle 23 und Abbildung 19 zusammengefasst.

Tabelle 23: Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Verwendung von EDTA oder Heparin als Antikoagulanzen gegenüber dem Serum (Nullwert)

	Mittelwert mmol/l	Differenz <sup>1</sup> mmol/l	p	s	Übereinstimmungsgrenzen		b <sup>1</sup>	r <sup>1</sup>	
					oben	unten			
NEFA	<b>Nullwert</b>	<b>0,39</b>							
	EDTA	0,31	<b>0,08</b>	0,03	0,11	0,3	-0,14	<b>0,20</b> <i>p&lt;0,05</i>	<b>0,67</b>
	HEPARIN	0,31	<b>0,08</b>	0,03	0,11	0,3	-0,14	<b>0,18</b> <i>p&lt;0,05</i>	<b>0,63</b>
BHB	<b>Nullwert</b>	<b>0,89</b>							
	EDTA	0,77	<b>0,12</b>	0,01	0,12	0,36	-0,12	-0,10 <i>n.s.</i>	-0,48
	HEPARIN	0,82	<b>0,07</b>	0,01	0,06	0,19	-0,04	-0,02 <i>n.s.</i>	-0,16

<sup>1</sup> **fett** – p < 0,05; *kursiv* – p < 0,1

Die mittlere Konzentration der EDTA- und Heparin-Plasmaproben unterscheidet sich signifikant für die BHB und die NEFA gegenüber dem Serum. Die Konzentrationen der NEFA und der BHB sind in den Plasmaproben geringer gegenüber den Serumproben.

Die geringfügige Abweichung der NEFA im Plasma gegenüber dem Serum ist verbunden mit einer großen Streuung und weiten Übereinstimmungsgrenzen. Es besteht ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem Wertebereich und der Differenz zwischen den Methoden. Im oberen Wertebereich sind die Plasmawerte der NEFA geringer als die Serumwerte. Die Differenz der Methoden, die Übereinstimmungsgrenzen und der Zusammenhang zwischen der Differenz und dem Wertebereich unterscheiden sich für die NEFA zwischen dem EDTA- und dem Heparin-Plasma nicht wesentlich.

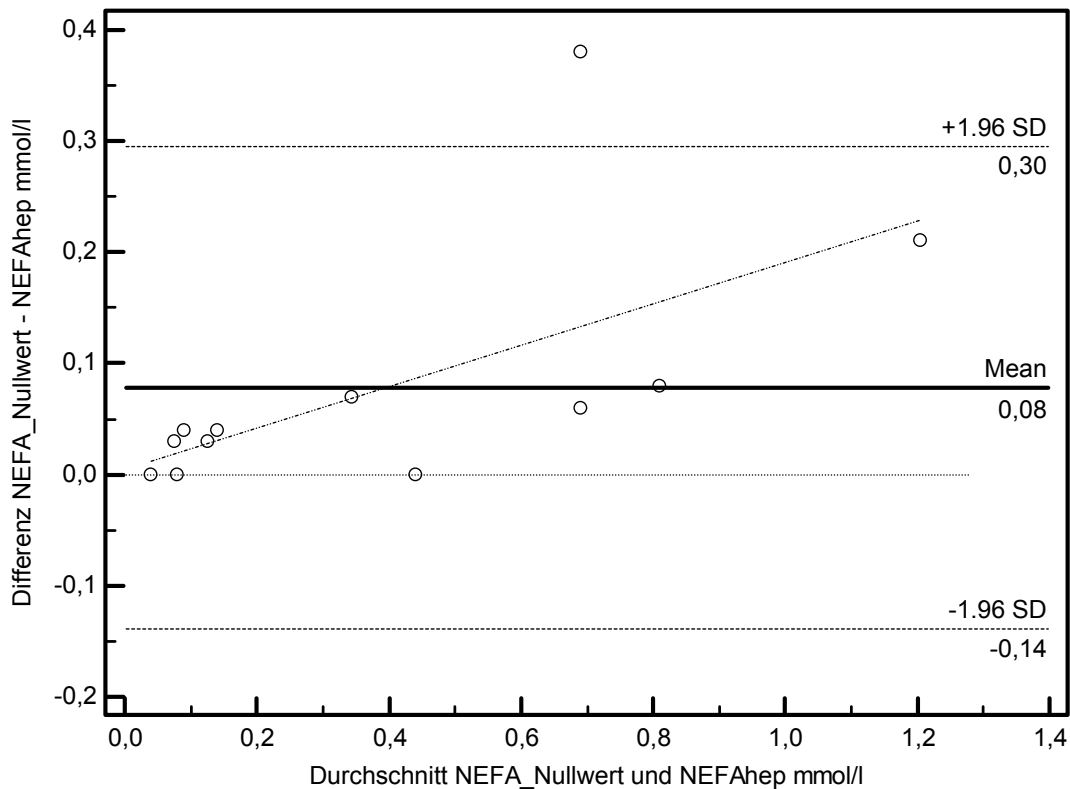


Abbildung 19: Bland-Altman-Methodenvergleich für die NEFA zwischen den Serumproben (Nullwert) und den Heparinplasmaproben (NEFAhep; n=12)

Die moderate signifikante Abweichung der BHB im EDTA-Plasma gegenüber dem Serum ist verbunden mit weiten Übereinstimmungsgrenzen. Dies ist bei Betrachtung des Heparin-Plasmas weniger ausgeprägt.

#### 4.1.5. Einfluss des Blutprobenentnahmeortes auf die Bestimmung der NEFA und der BHB

Die Ergebnisse zum Einfluss des Blutprobenentnahmeortes auf die Bestimmung der NEFA und der BHB sind in Tabelle 24 und den Abbildungen 20 und 21 zusammengefasst.

Die mittlere Differenz der Serumproben unterscheidet sich bei Punktion der V. jugularis externa nur für die BHB und bei Punktion der V. epigastrica cran. spf. für die NEFA und die BHB gegenüber der Punktion der Arteria oder Vena caudalis mediana. Die Konzentrationen der NEFA und der BHB sind bei Blutentnahme aus der V. epigastrica cran. spf. deutlich geringer gegenüber der Punktion der A./V. caudalis mediana.



Tabelle 24: Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Blutentnahme aus der V. jugularis externa (Halsvene) oder der V. epigastrica cran. spf. (Eutervene) gegenüber der Arteria oder Vena caudalis mediana (Nullwert)

	Mittelwert mmol/l	Differenz <sup>1</sup> mmol/l	p	s	Übereinstimmungsgrenzen		b <sup>1</sup>	r <sup>1</sup>
					oben	unten		
<b>Nullwert</b>	<b>0,70</b>							
NEFA Halsvene	0,64	0,06	0,16	0,13	0,32	-0,20	0,11 n.s.	0,13
NEFA Eutervene	0,56	<b>0,14</b>	0,02	0,13	0,49	-0,22	<b>0,41</b> p<0,05	<b>0,70</b>
<b>Nullwert</b>	<b>0,90</b>							
BHB Halsvene	0,82	<b>0,08</b>	0,01	0,08	0,25	-0,09	<b>0,06</b> p<0,05	<b>0,52</b>
BHB Eutervene	0,70	<b>0,20</b>	0,02	0,17	0,74	-0,33	<b>0,27</b> p<0,05	<b>0,88</b>

<sup>1</sup> fett – p < 0,05

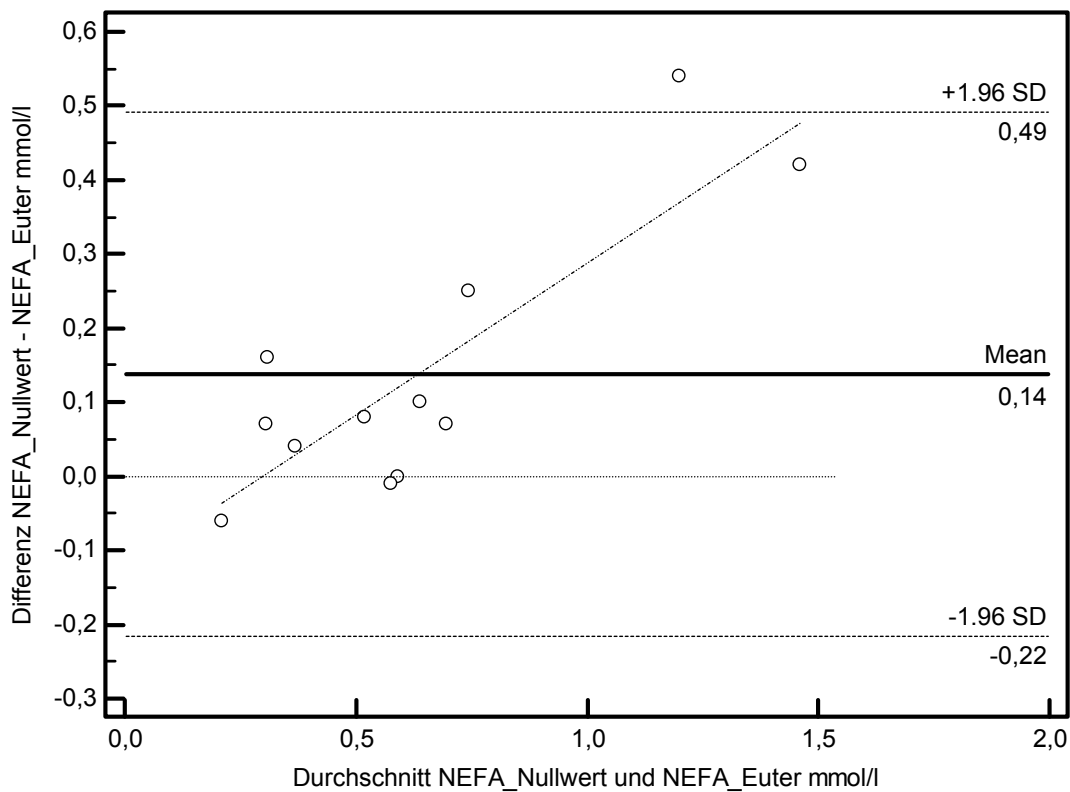


Abbildung 20: Bland-Altman-Methodenvergleich für die NEFA zwischen den Blutproben aus der A./V. caudalis mediana (NEFA\_Nullwert) und den Blutproben aus der V. epigastrica cranialis superficialis (NEFA\_Euter; n=12)

Die Punktion der V. jugularis externa unterscheidet sich für die NEFA nicht signifikant gegenüber der Punktion der A./V. caudalis mediana. Die Übereinstimmungsgrenzen sind jedoch relativ weit. Bei Punktion der V. epigastrica cran. spf. ist die Differenz der NEFA im oberen Wertebereich größer gegenüber der Punktion der A./V. caudalis mediana (Abb. 20). Die Übereinstimmungsgrenzen sind weit.

Die Konzentration der BHB ist im Blut der V. epigastrica cran. spf. am geringsten (Abb. 21). Es existiert zwar ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen dem Wertebereich und der Ausprägung der Differenz der Methoden bei Punktion der V. epigastrica cran. spf. Das Ergebnis wird allerdings stark beeinflusst von einem Ausreißer (mittlere Differenz 1,02mmol BHB/l). Bei Ausschluss dieses Wertes liegt dennoch eine signifikante mittlere Differenz von 0,13mmol BHB/l vor. Die Übereinstimmungsgrenzen betragen dann 0,32 und -0,06mmol BHB/l.

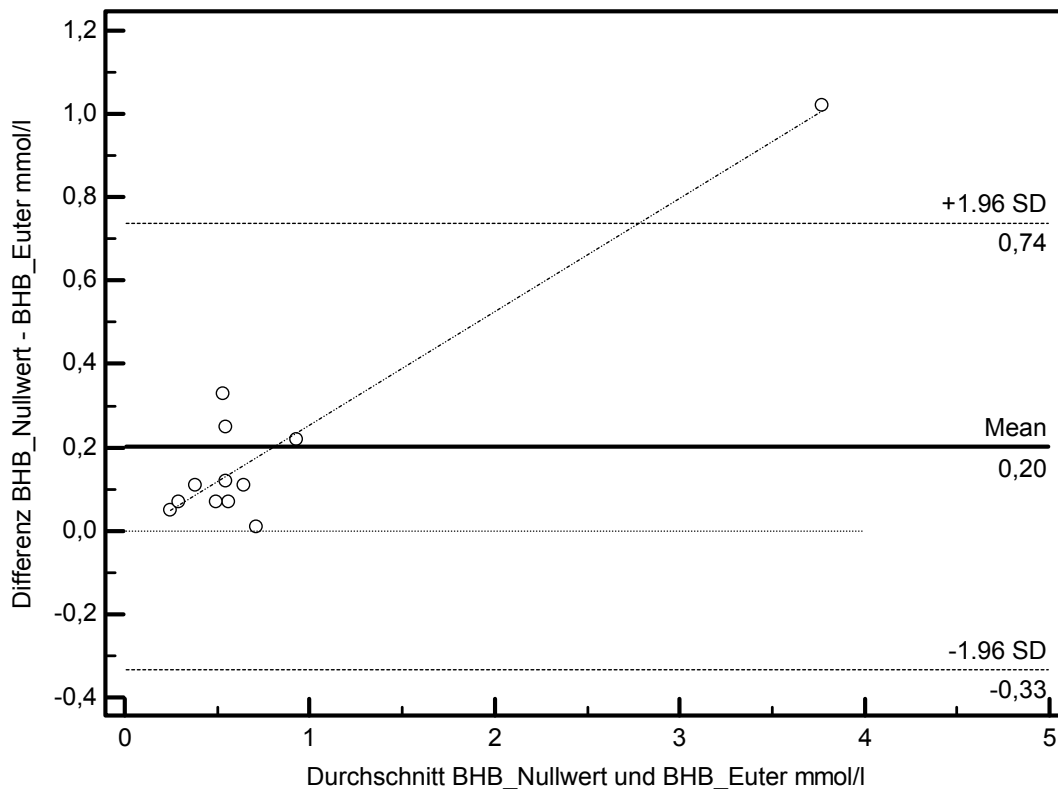


Abbildung 21: Bland-Altman-Methodenvergleich für die BHB zwischen den Blutproben aus der A./V. caudalis mediana (BHB\_Nullwert) und den Blutproben aus der V. epigastrica cranialis superficialis (BHB\_Euter; n=12)

#### 4.1.6. Einfluss der Lagerung von Vollblut ohne Antikoagulanzen, EDTA-Vollblut und Heparin-Vollblut für 24 Stunden bei Raum- oder Kühlschranktemperatur auf die Bestimmung der NEFA und der BHB

Die Ergebnisse zum Einfluss der Lagerung von Vollblut für 24 Stunden bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank auf die Bestimmung der NEFA und der BHB sind in Tabelle 25 zusammengefasst.

Tabelle 25: Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Lagerung von Vollblut ohne Antikoagulanz, EDTA-Vollblut und Heparin-Vollblut für 24 Stunden bei Raum- oder Kühlschranktemperatur gegenüber dem Nullwert

	Mittelwert mmol/l	Differenz <sup>1</sup> mmol/l	p	s	Übereinstimmungsgrenzen		b <sup>1</sup>	r <sup>1</sup>
					oben	unten		
<b>NEFA</b>	<b>0,38</b>							
Nullwert	<b>0,38</b>							
Serum 24h RT	0,37	0,01	0,66	0,09	0,18	-0,16	-0,24	n.s. -0,39
Serum 24h KT	0,40	-0,02	0,18	0,04	0,06	-0,10	0,01	n.s. 0,04
EDTA 24h RT	0,38	0,00	0,98	0,17	0,33	-0,33	-0,17	n.s. -0,11
EDTA 24h KT	0,34	0,04	0,15	0,09	0,22	-0,14	-0,02	n.s. -0,03
Heparin 24h RT	0,43	-0,05	0,23	0,13	0,20	-0,30	-0,01	n.s. -0,01
Heparin 24h KT	0,40	-0,02	0,06	0,03	0,04	-0,08	0,05	n.s. 0,17
<b>BHB</b>	<b>0,62</b>							
Nullwert	<b>0,62</b>							
Serum 24h RT	0,53	0,09	0,12	0,17	0,42	-0,24	-0,25	n.s. -0,42
Serum 24h KT	0,63	-0,01	0,22	0,03	0,05	-0,07	-0,01	n.s. -0,08
EDTA 24h RT	0,62	0,00	0,95	0,16	0,31	-0,31	0,04	n.s. 0,06
EDTA 24h KT	0,55	0,07	0,06	0,10	0,27	-0,13	-0,11	n.s. -0,29
Heparin 24h RT	0,60	0,02	0,81	0,16	0,33	-0,29	0,01	n.s. 0,01
Heparin 24h KT	0,62	0,00	0,71	0,06	0,12	-0,12	<b>-0,13</b>	p<0,05 <b>-0,60</b>

<sup>1</sup> **fett** – p < 0,05; *kursiv* – p < 0,1

Unabhängig von der Verwendung von Serum, EDTA oder Heparin als Antikoagulanz führt die Lagerung von Vollblut mit oder ohne Antikoagulanzen für 24 Stunden bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank zu keinen signifikanten Abweichungen bei der Bestimmung der NEFA und der BHB gegenüber dem Nullwert.

Die Lagerung des Vollblutes bei Raumtemperatur für 24 Stunden resultiert im Vergleich zur Lagerung des Vollblutes im Kühlschrank für 24 Stunden in weiteren Übereinstimmungsgrenzen der NEFA und der BHB. Dies trifft für die Verwendung von Serum, EDTA und Heparin zu. Mit Ausnahme der Lagerung von Heparinvollblut im Kühlschrank sind die Differenzen zufällig über den Wertebereich verteilt.

## 4.2. Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode

### 4.2.1. Tagesdynamik der NEFA und der BHB 1 Woche ante partum

Die Tagesprofile der NEFA und der BHB für die 10 pluriparen Kühe aus der Vorbereitergruppe befinden sich in den Abbildungen 22 und 23 und den Tabellen 26 bis 28. Die Tiere befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme  $7,6 \pm 4,6$  Tage vor dem Partus. Die Fütterung erfolgte einmalig unter Vorlage einer TMR um 11 Uhr.

Bei besonderer Betrachtung des Einflusses der Futtermittelvorgabe (11 Uhr) auf die Entwicklung der NEFA und der BHB im postprandialen Zeitraum (14 Uhr bis 2 Uhr) ist bei der BHB ein signifikanter Einfluss der Tageszeit in dem 20 Stunden-Tagesprofil vorhanden (Tab. 26). Das Tier als Zufallsfaktor hat einen signifikanten Einfluss in der Varianzanalyse bei den NEFA und der BHB.

Tabelle 26: Deskriptive Statistik und Einfluss der varianzanalytischen Faktoren auf das Tagesprofil der NEFA (mmol/l) und der BHB (mmol/l) eine Woche ante partum

Parameter	n	$\bar{x}$	$\pm$	s	Zeiteffekt <sup>1</sup>	Tiereffekt <sup>1</sup>
NEFA	60	0,16	$\pm$	0,17	p 0,470	p 0,001
BHB	60	0,48	$\pm$	0,14	p 0,001	p 0,001

<sup>1</sup> in der univariaten Varianzanalyse

Die mittlere Konzentration der NEFA nimmt im postprandialen Zeitraum ab (Tab. 27 und Abb. 22). Die Differenzen zwischen den Messzeitpunkten sind nur geringfügig und konnten nicht statistisch gesichert werden. Auffällig sind die beiden Tiere mit den höchsten mittleren NEFA-Konzentrationen (Kuh 2  $0,44 \pm 0,15$  mmol NEFA/l und Kuh 6  $0,43 \pm 0,26$  mmol NEFA/l). Bei diesen beiden Tieren sinkt die Konzentration der NEFA nach der Fütterung deutlich ab und steigt in der Nacht zumindest bei einem Tier deutlich wieder an.

Tabelle 27: Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des NEFA-Tagesprofils bei Kühen aus der Vorbereitergruppe

Uhrzeit	6Uhr	10Uhr	14Uhr	18Uhr	22Uhr	2Uhr
n	10	10	10	10	10	10
Mittelwert, mmol/l	0,17	0,19	0,13	0,12	0,16	0,20
s	0,17	0,19	0,10	0,09	0,15	0,27

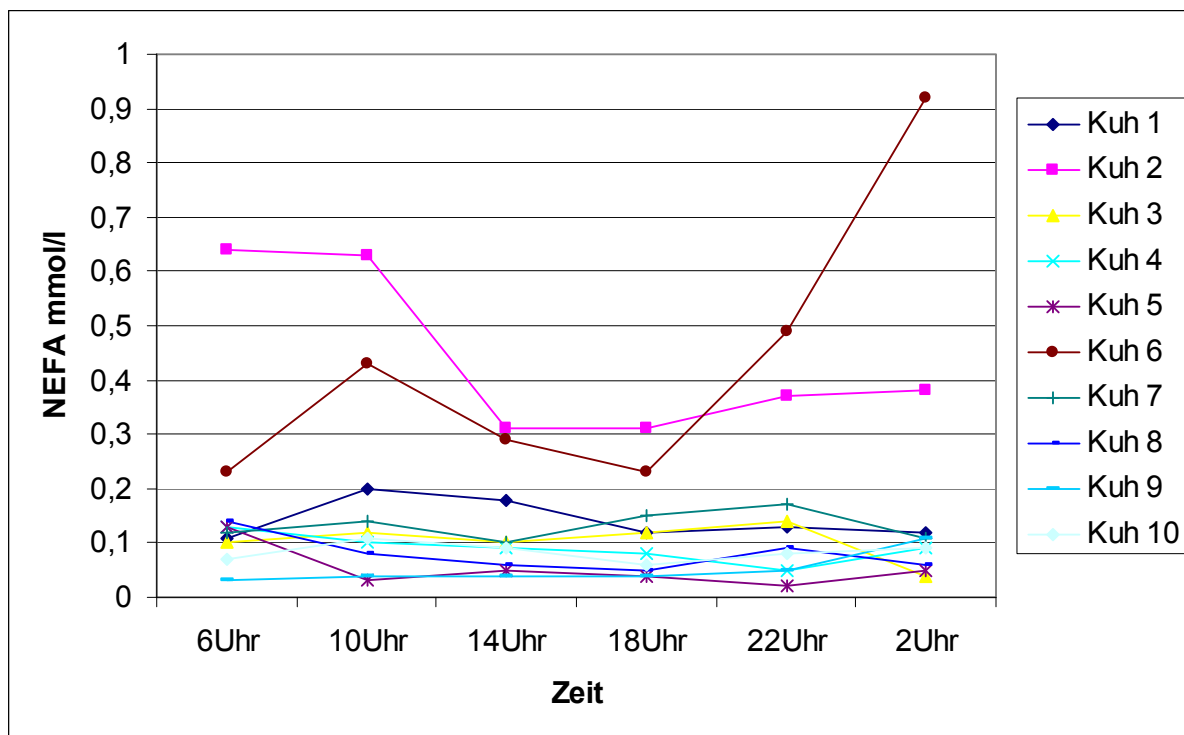


Abbildung 22: Tagesprofil der NEFA (Zeiteffekt n.s.) für 10 Kühe aus der Vorbereitergruppe (Futternvorlage um 11 Uhr)

Die Konzentration der BHB steigt im postprandialen Zeitraum an (Tab. 28 und Abb. 23). Gegenüber dem Messzeitpunkt um 6 Uhr ist die BHB-Konzentration um 14 Uhr signifikant höher. Gegenüber dem Messzeitpunkt um 10 Uhr sind die BHB-Konzentrationen um 14 Uhr und um 22 Uhr signifikant höher. Im postprandialen Zeitraum gibt es für die BHB keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten.

Tabelle 28: Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des BHB-Tagesprofils bei Kühen aus der Vorbereitergruppe

Uhrzeit	6Uhr	10Uhr	14Uhr	18Uhr	22Uhr	2Uhr
<b>n</b>	10	10	10	10	10	10
<b>Mittelwert, mmol/l</b>	0,42	0,37	0,58	0,50	0,54	0,49
<b>s</b>	0,11	0,10	0,15	0,15	0,13	0,13
<b>sig. Differenz zu<sup>1</sup></b>			<b>6Uhr</b> <b>10Uhr</b>		<b>10Uhr</b>	
	<b>14Uhr</b>	<b>14Uhr</b> <b>22Uhr</b>				

<sup>1</sup> fett – posthoc-Test nach Sidak  $p < 0,05$

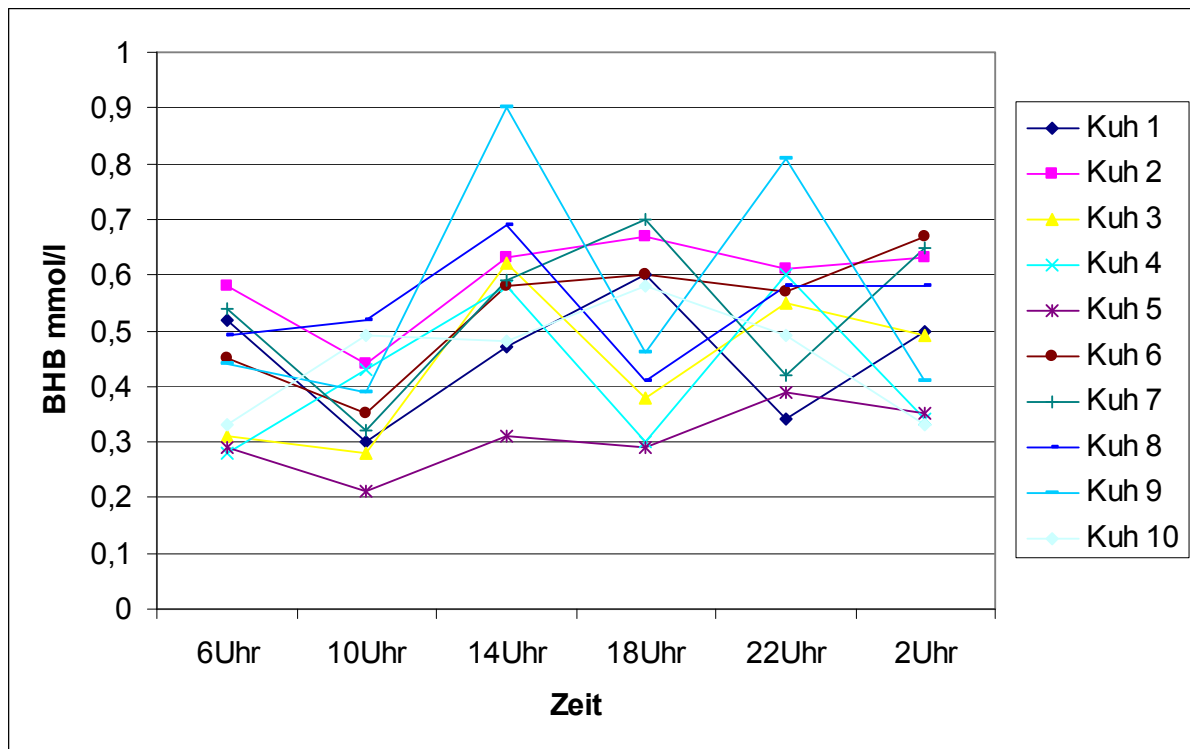


Abbildung 23: Tagesprofil der BHB (Zeiteffekt  $p < 0,05$ ) für 10 Kühe aus der Vorbereitergruppe (Futternvorlage um 11 Uhr)

#### 4.2.2. Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Frühlaktation

Die Tagesprofile der NEFA und der BHB für die 10 pluriparen Kühe aus der Frühlaktation befinden sich in den Abbildungen 24 und 25 und den Tabellen 29 bis 31. Die Tiere befanden sich zum Zeitpunkt der Probenentnahme  $7,9 \pm 6,07$  Tage post partum. Die Fütterung erfolgte einmalig unter Vorlage einer TMR um 10:30 Uhr. In dem 24 Stunden-Tagesprofil gibt es einen signifikanten Einfluss der Tageszeit bei den NEFA und bei der BHB (Tab. 29). Das Tier als Zufallsfaktor hat einen signifikanten Einfluss in der Varianzanalyse bei den NEFA und der BHB.

Tabelle 29: Deskriptive Statistik und Einfluss der varianzanalytischen Faktoren auf das Tagesprofil der NEFA (mmol/l) und der BHB (mmol/l) in der Frühlaktation

Parameter	n	$\bar{x}$	$\pm$	s	Zeiteffekt <sup>1</sup>	Tiereffekt <sup>1</sup>
NEFA	70	0,50	$\pm$	0,33	p 0,001	p 0,001
BHB	70	0,57	$\pm$	0,19	p 0,006	p 0,001

<sup>1</sup> in der univariaten Varianzanalyse

Bei besonderer Betrachtung des Einflusses der Futternvorlage (10:30 Uhr) auf die Entwicklung der NEFA und der BHB im postprandialen Zeitraum (14 Uhr bis 2 Uhr) ergeben sich zwei unterschiedliche Reaktionsmuster.

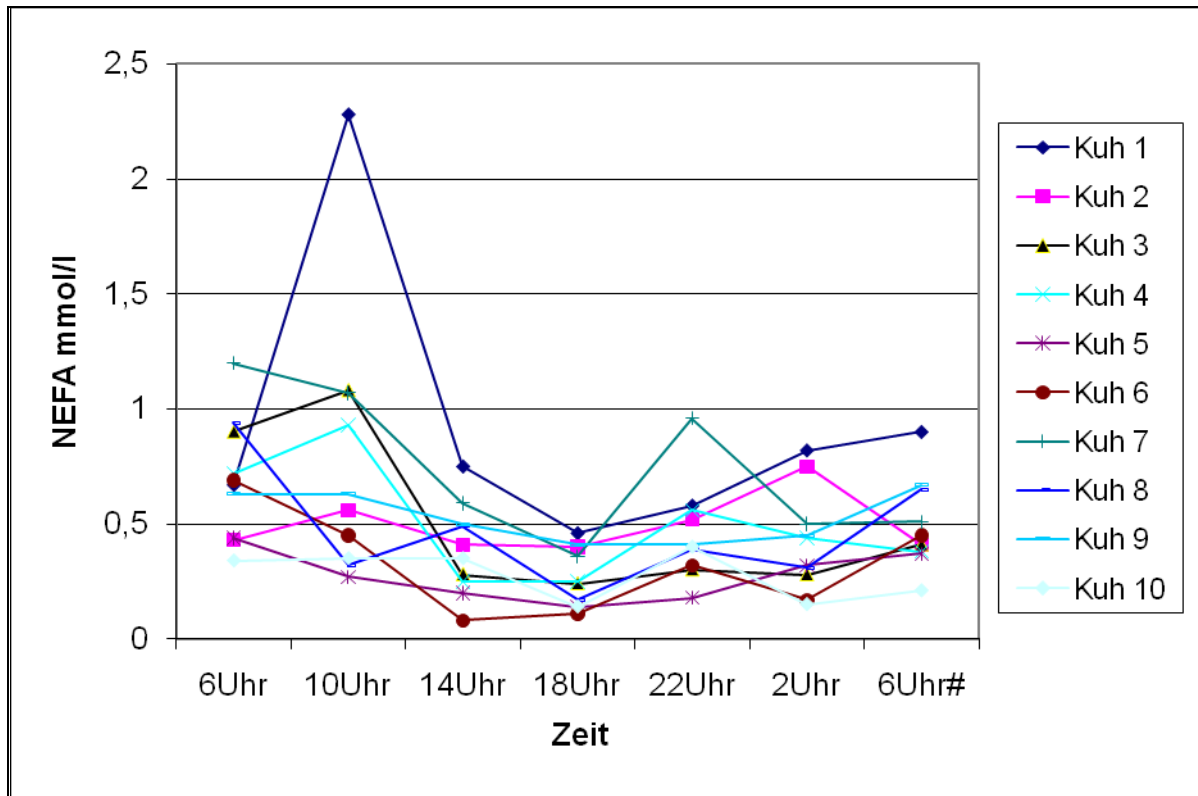
Die Konzentration der NEFA nimmt im postprandialen Zeitraum ab (Tab. 30 und Abb. 24). Die Konzentration der NEFA um 6 Uhr ist gegenüber dem Messzeitpunkt um 18 Uhr signifikant höher. Die Messzeitpunkte 6 Uhr und 10 Uhr unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die Konzentration der NEFA um 10 Uhr ist gegenüber Messung um 14 Uhr, 18 Uhr und 2 Uhr signifikant und gegenüber 22 Uhr tendenziell ( $p < 0,1$ ) höher. Die niedrigste Konzentration der NEFA wird um 18 Uhr erreicht. Im postprandialen Zeitraum unterscheiden sich die Messzeitpunkte nicht voneinander. Die Konzentration der NEFA um 6 Uhr am folgenden Tag unterscheidet sich nicht signifikant zu dem Messzeitpunkt 24 Stunden zuvor.

Tabelle 30: Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des NEFA-Tagesprofils bei 10 Kühen aus der Frischmelkergruppe

Uhrzeit	6Uhr	10Uhr	14Uhr	18Uhr	22Uhr	2Uhr	6Uhr <sup>2</sup>
n	10	10	10	10	10	10	10
Mittelwert, mmol/l	0,69	0,79	0,39	0,27	0,46	0,42	0,49
s	0,26	0,60	0,20	0,13	0,21	0,22	0,19
sig. Differenz zu <sup>1</sup>			<b>10Uhr</b>	<b>6Uhr</b> <b>10Uhr</b>	<i>10Uhr</i>	<b>10Uhr</b>	<i>10Uhr</i>
	<b>18Uhr</b>	<b>14Uhr</b> <b>18Uhr</b> <i>22Uhr</i> <b>2Uhr</b>					

<sup>1</sup> **fett** – posthoc-Test nach Sidak  $p < 0,05$ ; *kursiv* - posthoc-Test nach Sidak  $p < 0,1$ ;

<sup>2</sup> 6Uhr am folgenden Tag



# 6Uhr am folgenden Tag

Abbildung 24: Tagesprofil der NEFA (Zeiteffekt  $p < 0,05$ ) für 10 Kühe aus der Frischmelkergruppe (Futtermalage um 10:30 Uhr, Melkvorgang um 7:45 Uhr, 14:45 Uhr und 23:45 Uhr)

Die Konzentration der BHB steigt im postprandialen Zeitraum an (Tab. 31 und Abb. 25). Die Konzentration der BHB um 6 Uhr ist gegenüber der Messung um 14 Uhr und um 18 Uhr tendenziell niedriger. Die Messzeitpunkte 6 Uhr und 10 Uhr unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die höchste Konzentration der BHB wird um 14 Uhr und 18 Uhr erreicht. Danach nimmt die Konzentration der BHB ab. Gegenüber der BHB-Konzentration um 22 Uhr sind die BHB-Konzentrationen um 14 Uhr und um 18 Uhr tendenziell höher.

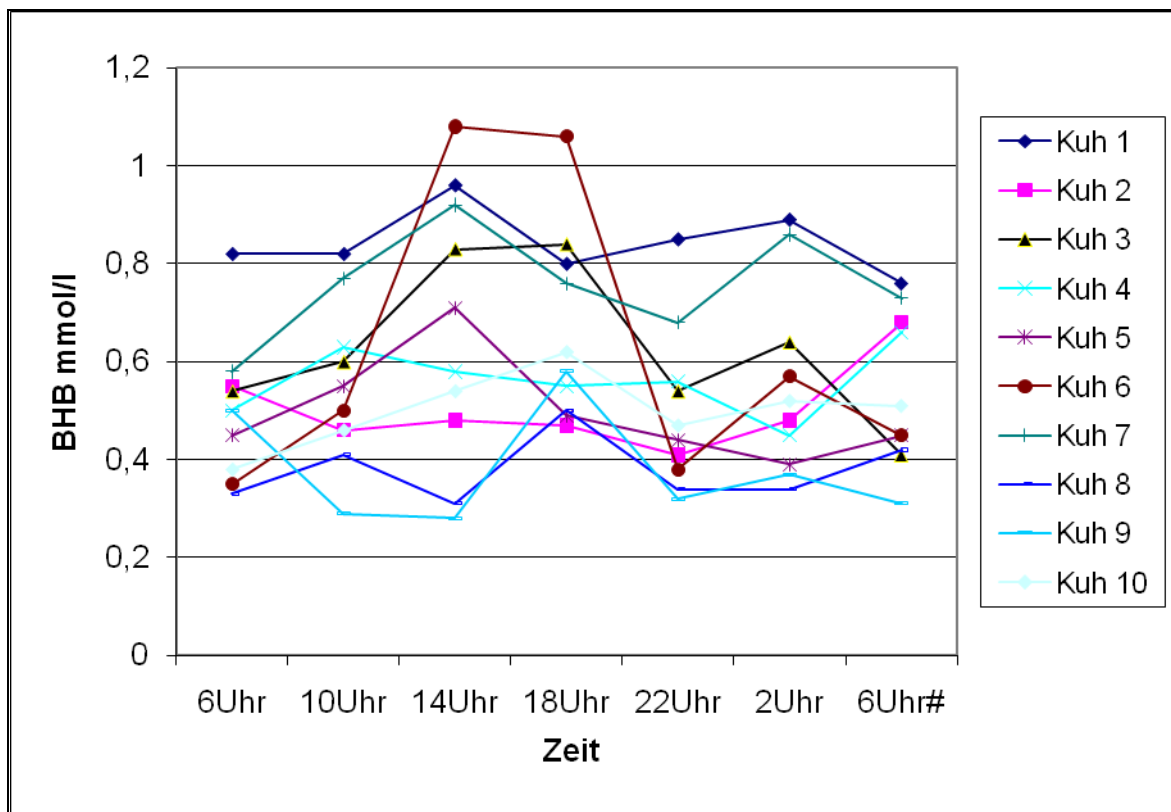
Tabelle 31: Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des BHB-Tagesprofils bei 10 Kühen aus der Frischmelkergruppe

Uhrzeit	6Uhr	10Uhr	14Uhr	18Uhr	22Uhr	2Uhr	6Uhr <sup>2</sup>
n	10	10	10	10	10	10	10
Mittelwert, mmol/l	0,50	0,55	0,67	0,67	0,50	0,55	0,54
s	0,14	0,16	0,27	0,19	0,16	0,19	0,15
sig. Differenz zu <sup>1</sup>			<i>6Uhr</i>	<i>6Uhr</i>			
	<i>14Uhr</i> <i>18Uhr</i>				<i>14Uhr</i> <i>18Uhr</i>		
			<i>22Uhr</i>	<i>22Uhr</i>			

<sup>1</sup> kursiv - posthoc-Test nach Sidak  $p < 0,1$ ;



<sup>2</sup> 6Uhr am folgenden Tag



# 6Uhr am folgenden Tag

Abbildung 25: Tagesprofil der BHB (Zeiteffekt  $p < 0,05$ ) für 10 Kühe aus der Frischmelkergruppe (Futtermalage um 10:30 Uhr, Melkvorgang um 7:45 Uhr, 14:45 Uhr und 23:45 Uhr)

### 4.3. Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode

Auf Grund der fehlenden Kenntnis des exakten Kalbedatums wurden die antepartalen Messzeitpunkte in Gruppen mit jeweils drei Tagen zusammengefasst. Obwohl die NEFA und die BHB zu den einzelnen Messzeitpunkten unterschiedlich stark von einer Normalverteilung abweichen, wurden parametrische Maße (Mittelwert und Standardabweichung) zur Beschreibung verwendet, da in allen Fällen eine symmetrische Verteilung gegeben ist (Tab. 32).

Die NEFA und die BHB zeigen im gesamten Versuchszeitraum eine ausgeprägte Laktationsdynamik. Der Zeitpunkt der Probenentnahme relativ zur Kalbung hat einen signifikanten Einfluss auf die NEFA im gesamten und antepartalen Untersuchungszeitraum. Im postpartalen Zeitraum ist dieser Einfluss nur tendenziell vorhanden (Tab. 33).

Bei der BHB ist der Einfluss des Probenentnahmezeitpunkts relativ zur Kalbung signifikant im gesamten und postpartalen Untersuchungszeitraum. Im antepartalen Untersuchungszeitraum hat der Probenentnahmezeitpunkt relativ zur Kalbung keinen signifikanten Einfluss auf die BHB (Tab. 33).

In allen varianzanalytischen Modellen der NEFA und der BHB hat das Tier als Zufallsfaktor einen signifikanten Einfluss.

Tabelle 32: Deskriptive Statistik und Prüfung auf Normalverteilung für die NEFA (mmol/l) und die BHB (mmol/l) im Versuchszeitraum

Zeit	n	NEFA				BHB			
		$\bar{x}$	$\pm$	s	$p^1$	$\bar{x}$	$\pm$	s	$p^1$
21-19d a.p.	45	0,17	$\pm$	0,23	0,000	0,66	$\pm$	0,21	0,042
18-16d a.p.	45	0,16	$\pm$	0,17	0,000	0,70	$\pm$	0,24	0,022
15-13d a.p.	46	0,15	$\pm$	0,12	0,000	0,66	$\pm$	0,17	<b>0,200</b>
12-10d a.p.	46	0,22	$\pm$	0,37	0,000	0,66	$\pm$	0,19	0,013
9-7d a.p.	46	0,22	$\pm$	0,20	0,000	0,68	$\pm$	0,21	0,048
6-4d a.p.	46	0,27	$\pm$	0,31	0,000	0,66	$\pm$	0,21	0,011
3-1d a.p.	45	0,28	$\pm$	0,23	0,000	0,62	$\pm$	0,15	<b>0,157</b>
Partus	46	0,90	$\pm$	0,33	<b>0,109</b>	0,48	$\pm$	0,17	<b>0,200</b>
6h p.p.	46	0,78	$\pm$	0,44	0,028	0,69	$\pm$	0,27	<b>0,102</b>
12h p.p.	46	0,73	$\pm$	0,42	<b>0,152</b>	0,63	$\pm$	0,23	<b>0,200</b>
24h p.p.	46	0,86	$\pm$	0,51	0,034	0,71	$\pm$	0,20	0,009
2d p.p.	46	0,67	$\pm$	0,33	<b>0,200</b>	0,78	$\pm$	0,31	0,001
3d p.p.	46	0,69	$\pm$	0,35	0,001	0,78	$\pm$	0,27	<b>0,175</b>
5d p.p.	46	0,82	$\pm$	0,36	<b>0,065</b>	0,91	$\pm$	0,35	<b>0,200</b>
7d p.p.	46	0,85	$\pm$	0,46	<b>0,054</b>	0,94	$\pm$	0,35	<b>0,200</b>
10d p.p.	46	0,82	$\pm$	0,48	0,000	1,02	$\pm$	0,51	0,043

<sup>1</sup> Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung; **fett** –  $p > 0,05$

Tabelle 33: Deskriptive Statistik und Einfluss der varianzanalytischen Faktoren auf die Dynamik der NEFA (mmol/l) und der BHB (mmol/l) im gesamten (21-19d a.p. bis 10d p.p.), antepartalen (21-19d a.p. bis 3-1d a.p.) und postpartalen (6h bis 10d p.p.) Versuchszeitraum

Parameter	Zeitraum	n	$\bar{x}$	$\pm$	s	Zeiteffekt <sup>1</sup>	Tiereffekt <sup>1</sup>
NEFA	gesamt	733	0,54	$\pm$	0,46	p 0,001	p 0,001
NEFA	ante partum	319	0,21	$\pm$	0,25	p 0,001	p 0,001
NEFA	post partum	368	0,78	$\pm$	0,42	p 0,055	p 0,001
BHB	gesamt	733	0,72	$\pm$	0,29	p 0,001	p 0,001
BHB	ante partum	319	0,68	$\pm$	0,20	p 0,265	p 0,001
BHB	post partum	368	0,81	$\pm$	0,34	p 0,001	p 0,001

<sup>1</sup> in der univariaten Varianzanalyse

Die mittlere Konzentration der NEFA steigt in der letzten Woche ante partum nur geringfügig an (Tab. 34 und Abb. 26). Dies konnte statistisch nicht gesichert werden. Innerhalb des antepartalen Untersuchungszeitraums unterscheiden sich nur die Messzeitpunkte 21-19d a.p. und 18-16d a.p. gegenüber der Messung 6-4d a.p. Die höchste mittlere Konzentration der NEFA wird zum Partus erreicht ( $0,90 \pm 0,33$ mmol NEFA/l). Die NEFA-Messung zum Partus unterscheidet sich signifikant zu allen antepartalen Zeitpunkten und zum Zeitpunkt 2d p.p. Im postpartalen Zeitraum gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten. Hier bleiben die NEFA bis zum Versuchsende auf einem relativ konstanten Niveau zwischen 0,63 und 0,72mmol/l.

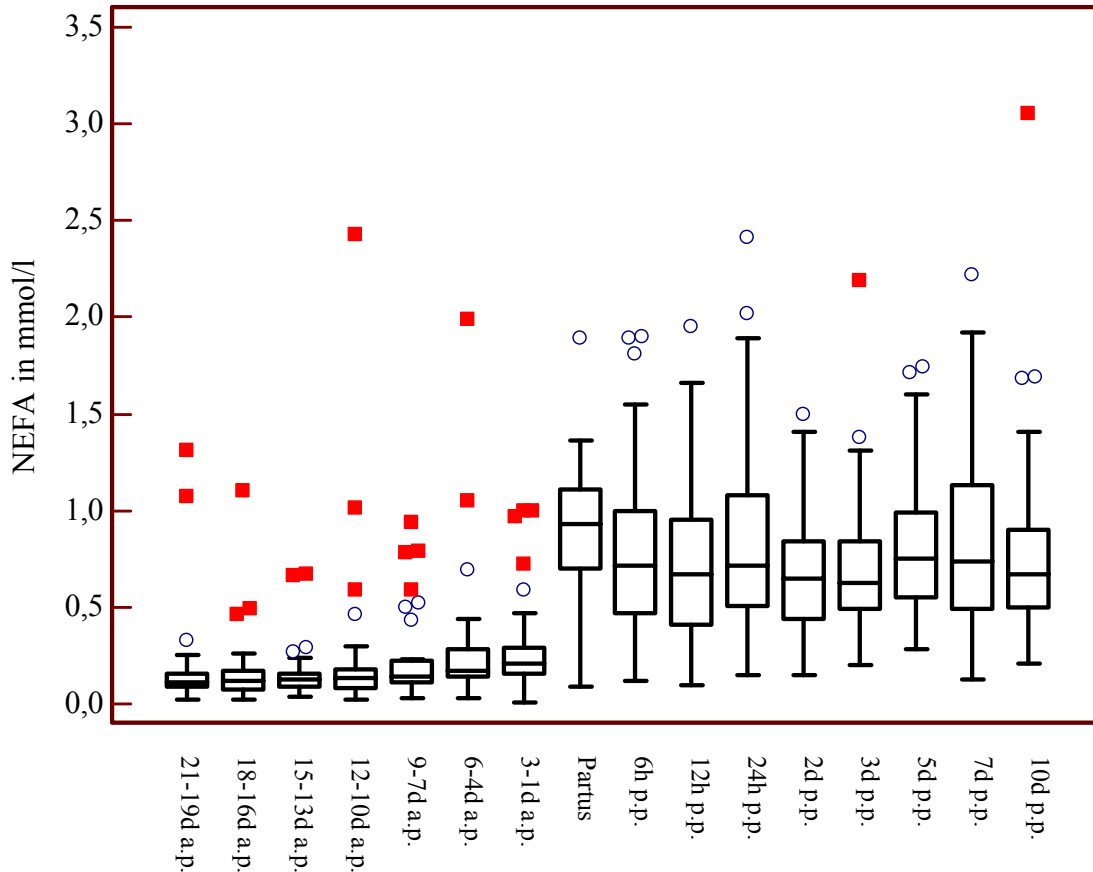


Abbildung 26: Boxplotdarstellung der NEFA im gesamten Versuchszeitraum

Tabelle 34: Mittlere Differenz der NEFA (mmol/l) durch paarweise Vergleiche der Messzeitpunkte im gesamten Versuchszeitraum

Zeit <sup>1</sup>	21-19d a.p.	18-16d a.p.	15-13d a.p.	12-10d a.p.	9-7d a.p.	6-4d a.p.	3-1d a.p.	Partus	6h p.p.	12h p.p.	24h p.p.	3d p.p.	5d p.p.	7d p.p.	10d p.p.
21-19d a.p.															
18-16d a.p.	0,01														
15-13d a.p.	0,01	0,01													
12-10d a.p.	-0,06	-0,06	-0,07												
9-7d a.p.	-0,05	-0,06	-0,06	0,00											
6-4d a.p.	<b>-0,10</b>	<b>-0,11</b>	-0,12	-0,05	-0,05										
3-1d a.p.	-0,11	-0,12	-0,13	-0,06	-0,06	-0,01									
Partus	<b>-0,73</b>	<b>-0,74</b>	<b>-0,74</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,68</b>	<b>-0,63</b>	<b>-0,62</b>								
6h p.p.	<b>-0,62</b>	<b>-0,63</b>	<b>-0,63</b>	<b>-0,57</b>	<b>-0,57</b>	<b>-0,52</b>	<b>-0,51</b>	0,11							
12h p.p.	<b>-0,57</b>	<b>-0,58</b>	<b>-0,59</b>	<b>-0,52</b>	<b>-0,52</b>	<b>-0,47</b>	<b>-0,46</b>	0,16	0,05						
24h p.p.	<b>-0,69</b>	<b>-0,70</b>	<b>-0,70</b>	<b>-0,63</b>	<b>-0,64</b>	<b>-0,59</b>	<b>-0,58</b>	0,04	-0,07	-0,12					
2d p.p.	<b>-0,51</b>	<b>-0,52</b>	<b>-0,52</b>	<b>-0,45</b>	<b>-0,46</b>	<b>-0,41</b>	<b>-0,40</b>	<b>0,22</b>	0,11	0,06	0,18				
3d p.p.	<b>-0,53</b>	<b>-0,53</b>	<b>-0,54</b>	<b>-0,47</b>	<b>-0,47</b>	<b>-0,42</b>	<b>-0,41</b>	0,20	0,10	0,05	0,17	-0,02			
5d p.p.	<b>-0,66</b>	<b>-0,66</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,60</b>	<b>-0,60</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,54</b>	0,07	-0,03	-0,08	0,03	-0,15	-0,13		
7d p.p.	<b>-0,66</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,67</b>	<b>-0,60</b>	<b>-0,61</b>	<b>-0,56</b>	<b>-0,54</b>	0,07	-0,04	-0,08	0,03	-0,15	-0,13	0,00	
10d p.p.	<b>-0,65</b>	<b>-0,66</b>	<b>-0,66</b>	<b>-0,59</b>	<b>-0,60</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,54</b>	0,08	-0,03	-0,08	0,04	-0,14	-0,13	0,01	0,01

<sup>1</sup> fett – posthoc-Test nach Sidak p < 0,05

Die Konzentration der BHB verändert sich im antepartalen Zeitraum nur geringfügig (Tab. 35 und Abb. 27). Zum Partus sinkt die Konzentration der BHB auf den geringsten Wert ( $0,48 \pm 0,17$  mmol BHB/l) im gesamten Versuchszeitraum. Die BHB-Konzentration zum Partus unterscheidet sich signifikant von allen anderen Messzeitpunkten. Im postpartalen Zeitraum kommt es zu einem schleichenden Anstieg der Konzentration der BHB. Ab dem 5. d p.p. gibt es signifikante Unterschiede zu den vorangegangenen Messzeitpunkten. Am 10. d p.p. wird die höchste mittlere Konzentration der BHB erreicht ( $1,02 \pm 0,51$  mmol BHB/l).

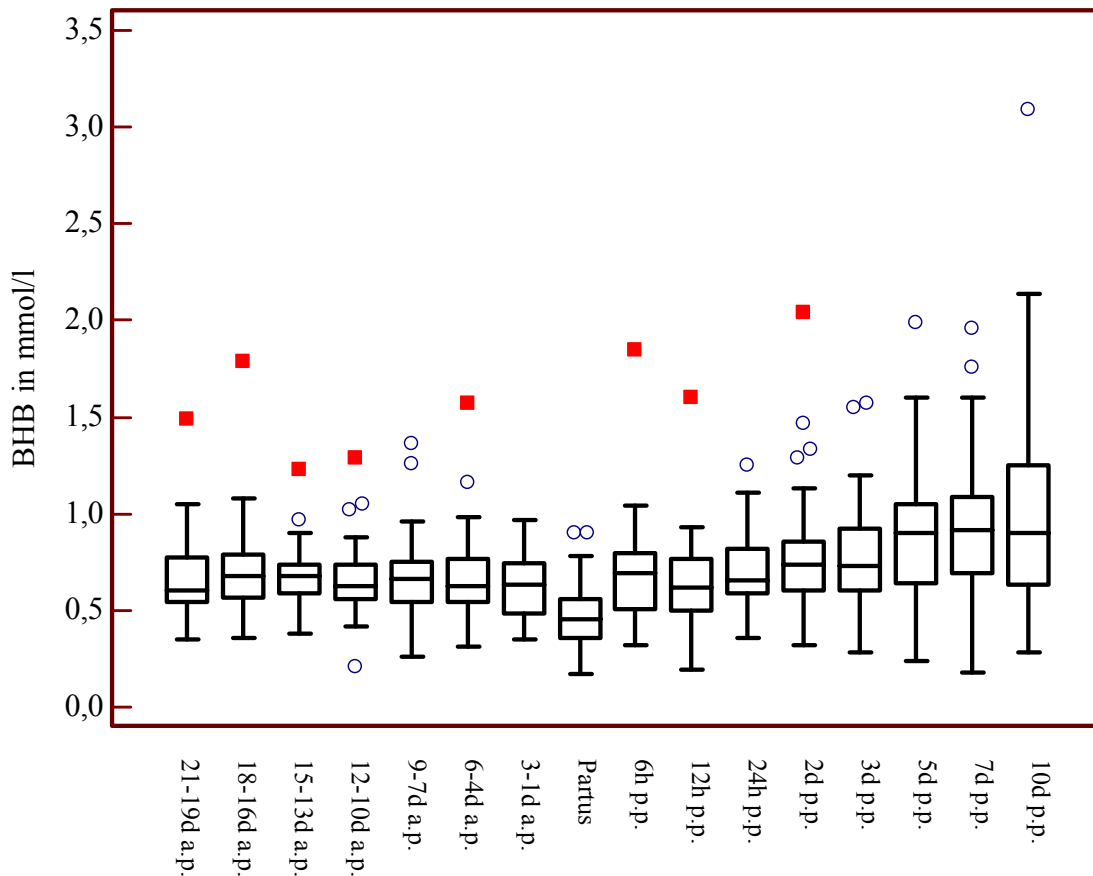


Abbildung 27: Boxplotdarstellung der BHB im gesamten Versuchszeitraum

Tabelle 35: Mittlere Differenz der BHB (mmol/l) durch paarweise Vergleiche der Messzeitpunkte im gesamten Versuchszeitraum

Zeit <sup>1</sup>	21-19d a.p.	18-16d a.p.	15-13d a.p.	12-10d a.p.	9-7d a.p.	6-4d a.p.	3-1d a.p.	Partus	6h p.p.	12h p.p.	24h p.p.	2d p.p.	3d p.p.	5d p.p.	7d p.p.	10d p.p.
21-19d a.p.																
18-16d a.p.	-0,04															
15-13d a.p.	0,00	0,04														
12-10d a.p.	-0,01	0,04	0,00													
9-7d a.p.	-0,03	0,01	-0,03	-0,02												
6-4d a.p.	-0,02	0,03	-0,01	-0,01	0,01											
3-1d a.p.	0,03	0,07	0,03	0,04	0,06	0,05										
Partus	<b>0,17</b>	<b>0,21</b>	<b>0,17</b>	<b>0,18</b>	<b>0,20</b>	<b>0,19</b>	<b>0,14</b>									
6h p.p.	-0,04	0,00	-0,04	-0,03	-0,01	-0,02	-0,07	<b>-0,21</b>								
12h p.p.	0,02	0,06	0,02	0,02	0,05	0,03	-0,02	<b>-0,15</b>	0,06							
24h p.p.	-0,06	-0,02	-0,06	-0,05	-0,03	-0,04	-0,09	<b>-0,23</b>	-0,02	-0,08						
2d p.p.	-0,12	-0,08	-0,12	-0,12	-0,09	-0,10	-0,15	<b>-0,29</b>	-0,08	-0,14	-0,06					
3d p.p.	-0,13	-0,09	-0,13	-0,13	-0,10	-0,12	<b>-0,17</b>	<b>-0,30</b>	-0,10	-0,15	-0,07	-0,01				
5d p.p.	<b>-0,26</b>	-0,21	<b>-0,25</b>	<b>-0,25</b>	-0,23	-0,24	<b>-0,29</b>	<b>-0,43</b>	<b>-0,22</b>	<b>-0,27</b>	<b>-0,20</b>	-0,13	-0,12			
7d p.p.	<b>-0,29</b>	-0,25	<b>-0,29</b>	<b>-0,29</b>	<b>-0,26</b>	<b>-0,28</b>	<b>-0,32</b>	<b>-0,46</b>	<b>-0,25</b>	<b>-0,31</b>	<b>-0,23</b>	-0,17	-0,16	-0,04		
10d p.p.	<b>-0,38</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,38</b>	<b>-0,38</b>	<b>-0,35</b>	<b>-0,37</b>	<b>-0,41</b>	<b>-0,55</b>	<b>-0,34</b>	<b>-0,40</b>	<b>-0,32</b>	-0,26	-0,25	-0,13	0,09	

<sup>1</sup> fett – posthoc-Test nach Sidak  $p < 0,05$

## 4.4. Untersuchung der Poolproben

### 4.4.1. Anzahl der Proben je Pool/Betrieb

Die 278 Poolproben setzen sich aus 2298 Einzelproben zusammen. Die Anzahl der gewonnenen Proben je Betrieb und Pool variiert von zwei bis zehn Proben. Die mittlere Anzahl Proben je Pool beträgt 8,26 Proben je Betrieb. Tabelle 36 gibt Auskunft über die absolute und relative Häufigkeit der Proben je Pool.

Tabelle 36: Absolute und relative Häufigkeit der Proben je Pool

Anzahl der Proben je Pool/Betrieb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Gesamt
Häufigkeit	0	2	3	10	21	17	32	32	51	110	278
in %	0	0,7	1,1	3,6	7,6	6,1	11,5	11,5	18,3	39,6	100

### 4.4.2. Einzelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum

Die Tabelle 37 zeigt die deskriptive Statistik für die 2298 Einzelwerte der NEFA und der BHB. Die Verwendung der Standardabweichung und des Variationskoeffizienten ist nur für normalverteilte Parameter geeignet. Auf Grund der weiten Verbreitung dieser Maßzahlen sollen sie hier trotzdem aufgeführt werden.

Tabelle 37: Deskriptive Statistik der Einzelwerte der NEFA und der BHB

	n	Min	Max	Mittelwert	Standardabweichung	Variationskoeffizient	Median	1.Quartil	3.Quartil	Quartilsabstand
<b>NEFA</b>	2298	0,02	3,06	0,78	0,52	66,7	0,66	0,40	1,05	0,65
<b>BHB</b>	2298	0,06	6,40	1,01	0,72	71,3	0,81	0,61	1,11	0,50

Der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman beträgt 0,42 ( $p < 0,05$ ) zwischen NEFA und BHB in der ersten Woche p.p.

Die Abbildung 28 und 29 zeigt die relative Häufigkeit der 2298 Einzelbeobachtungen der NEFA und der BHB, wobei die Normalverteilung als blaue Linie dargestellt ist. Die Schiefe der Verteilungsfunktionen der NEFA und der BHB beträgt 1,14 und 2,96. Die Verteilungsfunktion der BHB ist mehr linkssteil-rechtsschief als die der NEFA. Die Kurtosis beträgt für die NEFA 1,24 und für die BHB 11,48. Die Verteilungsfunktion der BHB ist schmalgipfeliger als die der NEFA.

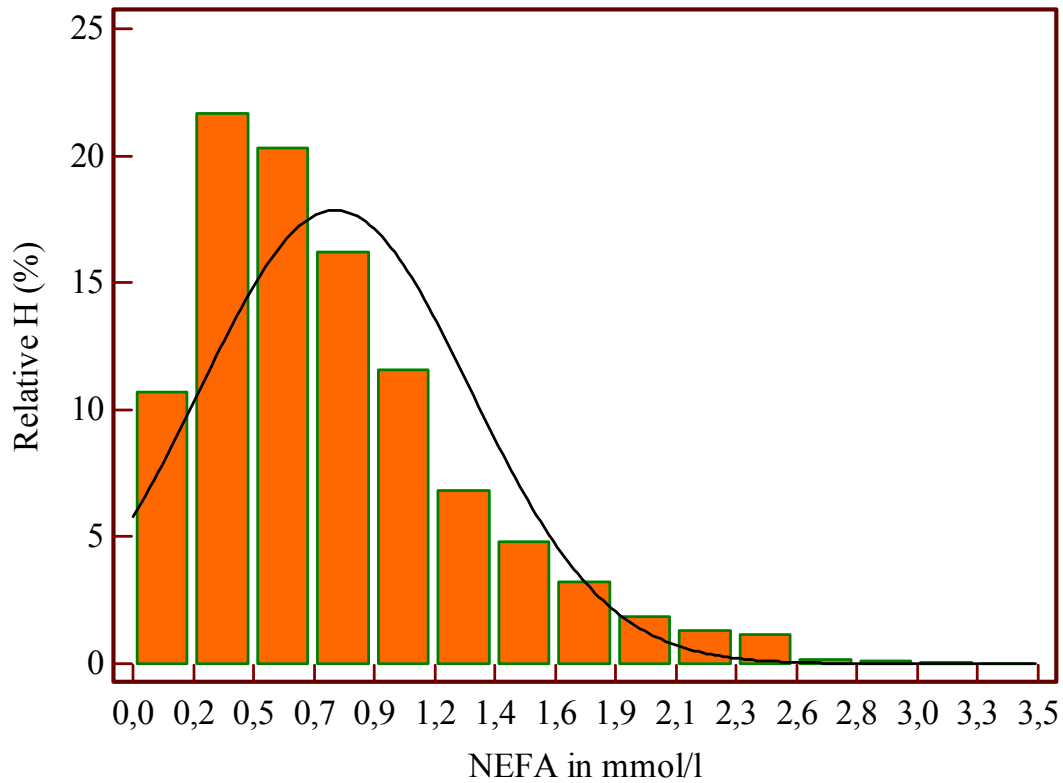


Abbildung 28: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der NEFA (n=2298)

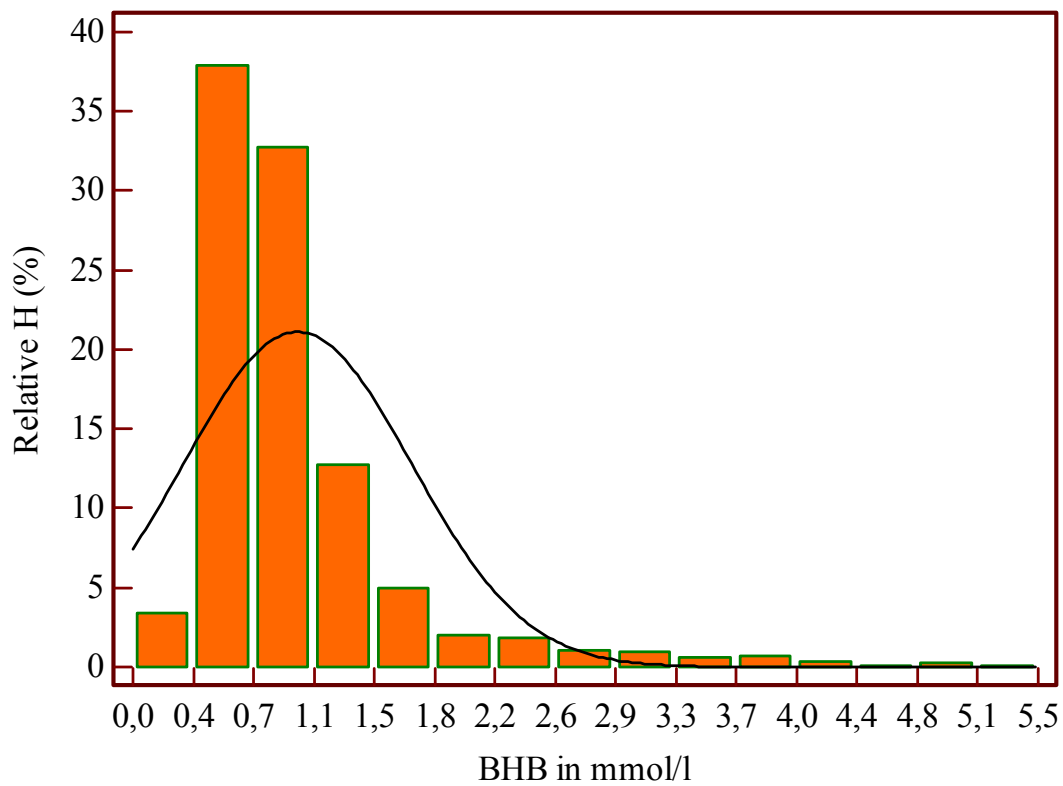


Abbildung 29: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der BHB (n=2298)



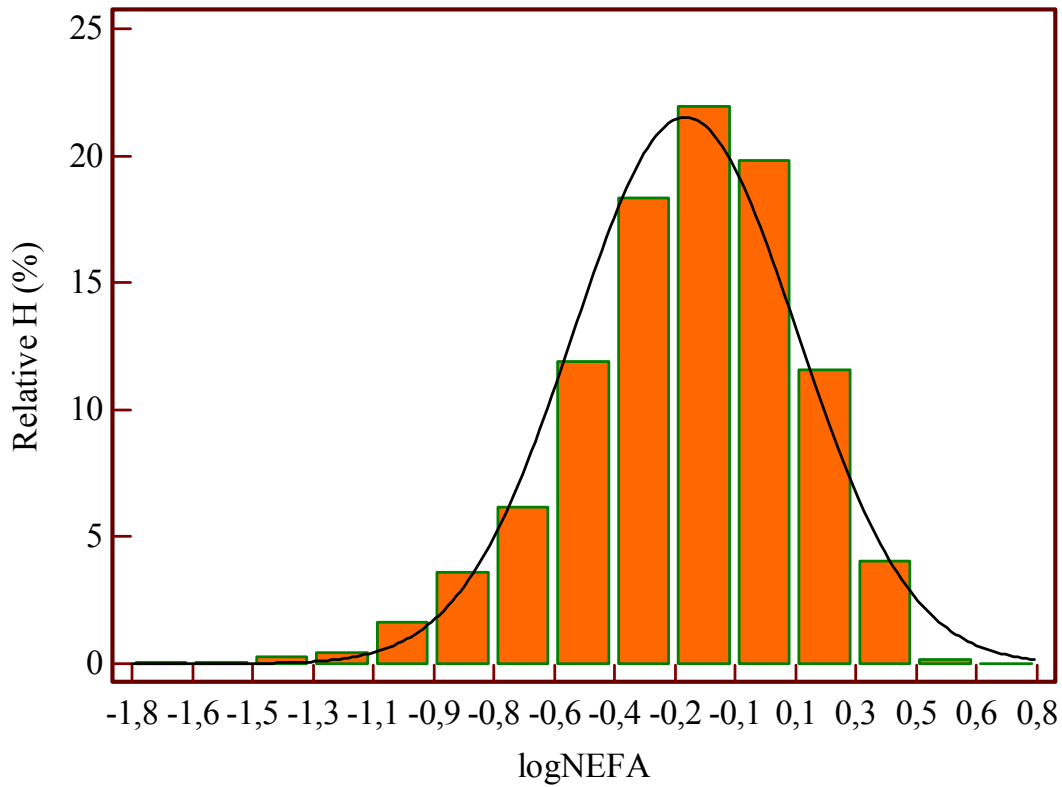


Abbildung 30: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der NEFA nach logarithmischer Transformation (n=2298)

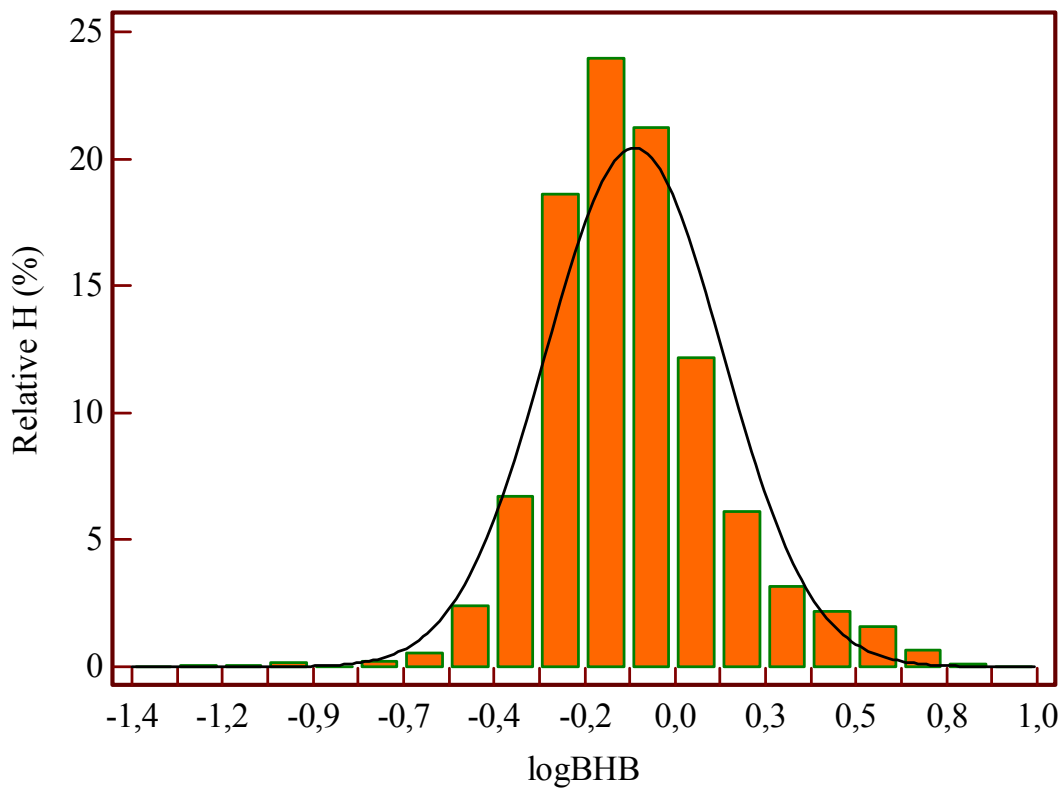


Abbildung 31: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der BHB nach logarithmischer Transformation (n=2298)

Die Abbildungen 30 und 31 zeigen die relative Häufigkeit der Einzelbeobachtungen der NEFA und der BHB nach logarithmischer Transformation. Die Schiefe der Verteilungsfunktionen der NEFA und der BHB nach logarithmischer Transformation beträgt -0,59 und 0,52. Die Kurtosis beträgt für die NEFA 0,44 und für die BHB 1,57.

Die Tabelle 38 gibt einen Überblick über den absoluten und relativen Anteil der Einzelbeobachtungen, welche über den in der Literatur empfohlenen Grenzwerten für die NEFA, die SCK und die klinische Ketose liegen. Zusätzlich wird der absolute und relative Anteil an Extremwerten ( $\bar{x} + 3 \times s$ ) dargestellt.

Tabelle 38: Absoluter und relativer Anteil der Einzelmesswerte der NEFA und der BHB über einem Grenzwert

NEFA			BHB		
Grenzwert	n	%	Grenzwert	n	%
>0,6mmol/l	1279	55,66	>1,0mmol/l	755	32,85
>0,7mmol/l	1088	47,35	>1,2mmol/l	482	20,97
>0,8mmol/l	921	40,08	>1,4mmol/l	349	15,19
>1,0mmol/l	629	27,37	>3,0mmol/l	74	3,22
$\bar{x} + 3s = 2,34\text{mmol/l}$	34	1,48	$\bar{x} + 3s = 3,17\text{mmol/l}$	63	2,74

Bei der BHB gibt es mehr Extremwerte als bei den NEFA. Bei den NEFA befinden sich 34 Tiere (1,48%) oberhalb des Bereiches Mittelwert plus dreifacher Standardabweichung und bei der BHB sind es 63 Tiere (2,74%).

#### 4.4.3. Pool- und Mittelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum

Die Tabelle 39 zeigt die statistischen Maßzahlen der 278 Mittel- und Poolwerte der NEFA und der BHB. Die Grundlage für die Berechnung sind die Mittel- und Poolwerte aus den Einzelwerten. Die Mittelwerte sind nahezu identisch mit denen aus Tabelle 37. Die Standardabweichung und die Variationskoeffizienten nehmen erwartungsgemäß ab.

Tabelle 39: Deskriptive Statistik der Mittel- und Poolwerte der NEFA und der BHB

	n	Min	Max	Mittelwert	Standard abweichung	Variations koeffizient	Median	1.Quartil	3.Quartil	Quartils abstand
<b>NEFA MW</b>	278	0,12	1,98	0,79	0,34	43,04	0,73	0,53	0,98	0,45
<b>NEFA Pool</b>	278	0,12	2,07	0,79	0,35	44,30	0,73	0,54	0,99	0,45
<b>BHB MW</b>	278	0,35	2,41	1,01	0,36	35,64	0,93	0,75	1,17	0,42
<b>BHB Pool</b>	278	0,34	2,39	1,01	0,36	35,64	0,92	0,75	1,19	0,44

Die Abbildung 32 und 33 zeigt die relative Häufigkeit der 278 Poolwerte der NEFA und der BHB, wobei die Normalverteilung als blaue Linie dargestellt ist. Sowohl die NEFA als auch die BHB tendieren zur Normalverteilung analog dem zentralen Grenzwertsatz.

Die Schiefe der Verteilungsfunktionen der NEFA und der BHB beträgt 0,81 und 1,20. Die Kurtosis beträgt für die NEFA 0,57 und für die BHB 1,91.

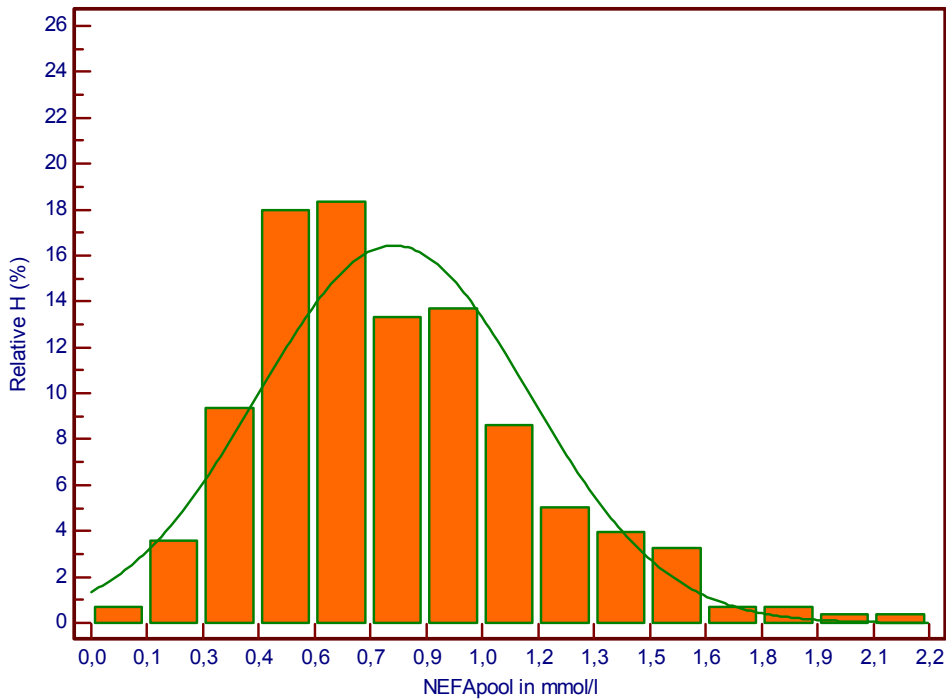


Abbildung 32: Relative Häufigkeit (H) der Poolwerte der NEFA (n=278)

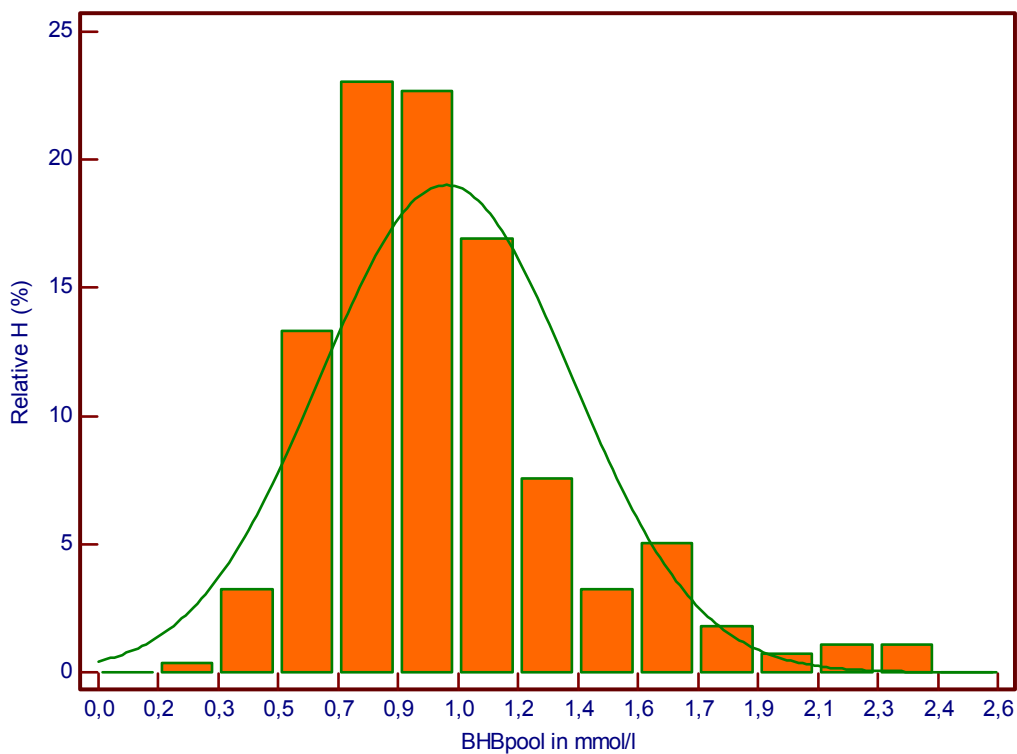


Abbildung 33: Relative Häufigkeit (H) der Poolwerte der BHB (n=278)

#### 4.4.4. Prüfung auf Normalverteilung

Eine Voraussetzung für die Anwendung parametrischer Testverfahren ist die Normalverteilung der Daten. Unter Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden die Einzel-, die Mittel- und die Poolwerte auf Normalverteilung überprüft. Bei Unterschreiten der Irrtumswahrscheinlichkeit  $p = 0,05$  kann nicht mehr von einer Normalverteilung ausgegangen werden. Nach diesem Verfahren weisen lediglich die Poolwerte mit einer Stichprobengröße von  $n = 10$  eine statistisch gesicherte Normalverteilung auf.

Unabhängig vom Testergebnis des Kolmogorov-Smirnov-Tests wurden bei Betrachtung der Mittel- und Poolwerte parametrische Testverfahren angewandt, da nach dem zentralen Grenzwertsatz der Wahrscheinlichkeitsrechnung die Mittelwerte-Verteilung zu einer Normalverteilung tendiert, unabhängig von der Verteilungsform der einzelnen Messwerte (Herdt 2000b). Die Ergebnisse sind in Tabelle 40 zusammengefasst.

Tabelle 40: Prüfung der Einzel-, Mittel- und Poolwerte der NEFA und der BHB auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test

Parameter	Einzelwerte		Mittelwerte		Poolwerte		Poolwerte n=10	
	n	p	n	p	n	p	n	p
<b>NEFA</b>	2298	<0,001	278	0,016	278	0,022	110	0,333
<b>BHB</b>	2298	<0,001	278	0,007	278	0,005	110	0,105

#### 4.4.5. Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwerten

##### 4.4.5.1. Lineare Regression

Die Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der Regressionsanalyse für die Mittel- und Poolwerte der NEFA und der BHB. Die Regressionsgleichung für die Beziehung zwischen dem Mittel- und dem Poolwert der NEFA entspricht  $y = 0,019 + 1,02 x$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,97$ . Die 95%-Konfidenzgrenzen für den Anstieg betragen 1,000 und 1,044 und für die Konstante -0,038 und 0,000. Die Regressionsgleichung für die Beziehung zwischen dem Mittel- und dem Poolwert der BHB entspricht  $y = 0,006 + 0,98 x$  mit einem Bestimmtheitsmaß von  $R^2 = 0,96$ . Die 95%-Konfidenzgrenzen für den Anstieg betragen 0,965 und 1,014 und für die Konstante -0,020 und 0,032. Die 95%-Konfidenzintervalle der Regressionsgeraden der NEFA und der BHB schließen beide die Idealgerade  $y = x$  ein.

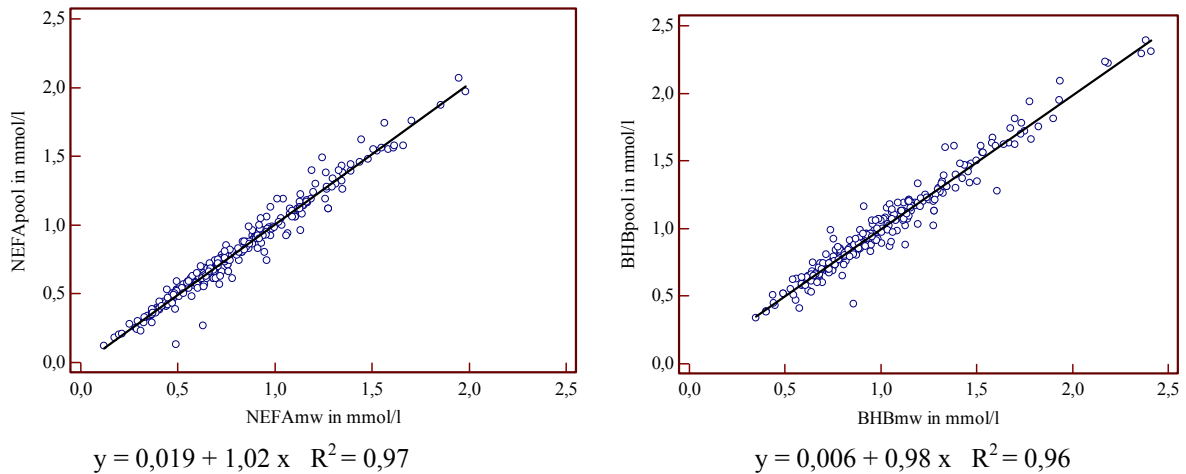


Abbildung 34: Lineare Regressionsanalyse zwischen den Mittel- und Poolwerten der NEFA und der BHB (n=278)

#### 4.4.5.2. Bland-Altman Methodenvergleich

Die Ergebnisse des Bland-Altman-Methodenvergleichs sind in Tabelle 41 und den Abbildungen 35 bis 38 zusammengefasst. Beim Vergleich der beiden Methoden unter Anwendung des Bland-Altman-Methodenvergleichs ergeben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Mittel- und dem Poolwert der NEFA und der BHB. Die absoluten Übereinstimmungsgrenzen für die NEFA betragen -0,12mmol/l (95%-Konfidenzintervall -0,138 bis -0,112mmol/l) und 0,13mmol/l (95%-Konfidenzintervall 0,114 bis 0,140 mmol/l) und die relativen Übereinstimmungsgrenzen betragen -20,47% (95%-Konfidenzintervall -22,68 bis 18,25%) und 22,5% (95%-Konfidenzintervall 20,29 bis 24,72%).

Tabelle 41: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der NEFA und der BHB

Parameter	N	Differenz mmol/l	p	s	Übereinstimmungsgrenzen		b <sup>1</sup>	r <sup>1</sup>
					oben	unten		
<b>NEFA</b>	278	0,001	0,76	0,06	0,13	-0,12	<b>-0,04</b> <sup>p&lt;0,05</sup>	<b>-0,21</b>
<b>BHB</b>	278	0,005	0,25	0,07	0,15	-0,14	-0,01 <sup>n.s.</sup>	-0,05

<sup>1</sup> fett – p < 0,05

Hiernach liefert der Poolwert der NEFA in 95% der Fälle einen Wert, der bis zu 0,13mmol/l bzw. 22,5% kleiner und 0,12mmol/l bzw. 20,47% größer ist als der arithmetische Mittelwert aus den Einzelwerten. Die absoluten Übereinstimmungsgrenzen für die BHB betragen -0,14mmol/l (95%-Konfidenzintervall -0,156 bis -0,126mmol/l) und 0,15mmol/l (95%-Konfidenzintervall 0,136 bis 0,166mmol/l) und die relativen Übereinstimmungsgrenzen betragen -15,16% (95%-Konfidenzintervall -16,8 bis 13,53%) und 16,59% (95%-Konfidenzintervall 14,96 bis 18,23%). Der Regressionskoeffizient zeigt für die NEFA einen geringfügigen signifikanten Trend an, dass der

Poolwert bei höheren Messwerten größer ist, als der arithmetische Mittelwert. Bei Verwendung der relativen Differenz beträgt der Regressionskoeffizient für die NEFA -5,81 und für die BHB -1,68.

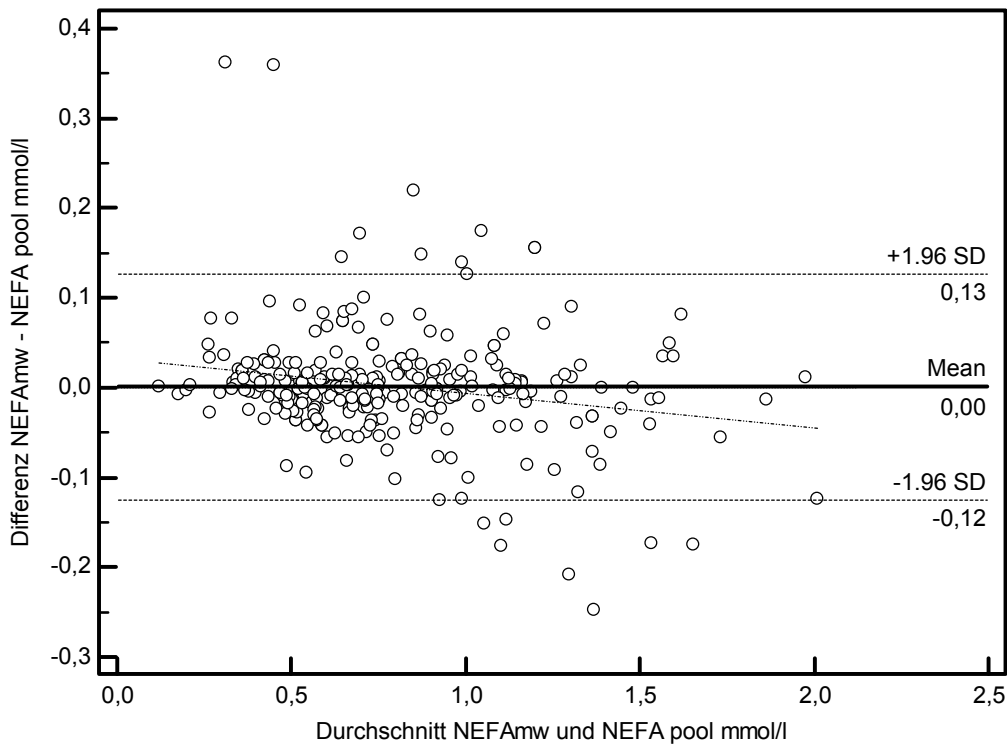


Abbildung 35: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der NEFA mit der absoluten Differenz (n=278)

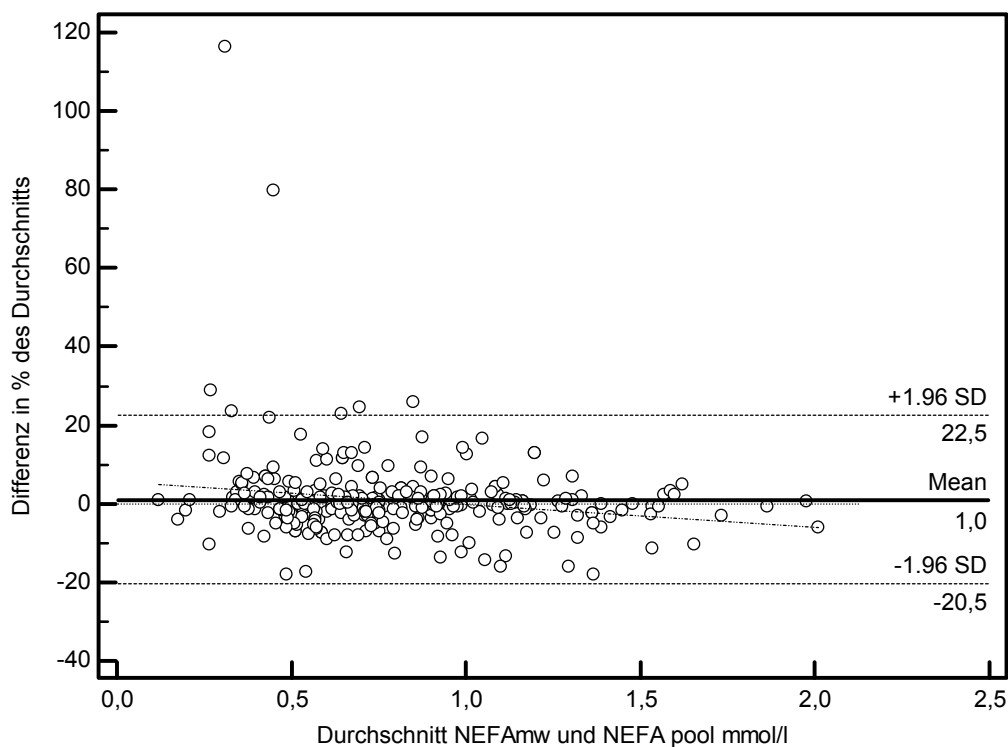


Abbildung 36: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der NEFA mit der prozentualen Differenz (n=278)

Um den Einfluss der beiden Ausreißer (links oben) auf die relativen Übereinstimmungsgrenzen der NEFA zu demonstrieren, sei darauf hingewiesen, dass sich bei Ausschluss dieser beiden Werte die relativen Übereinstimmungsgrenzen auf -13,5% und 14,1% reduzieren.

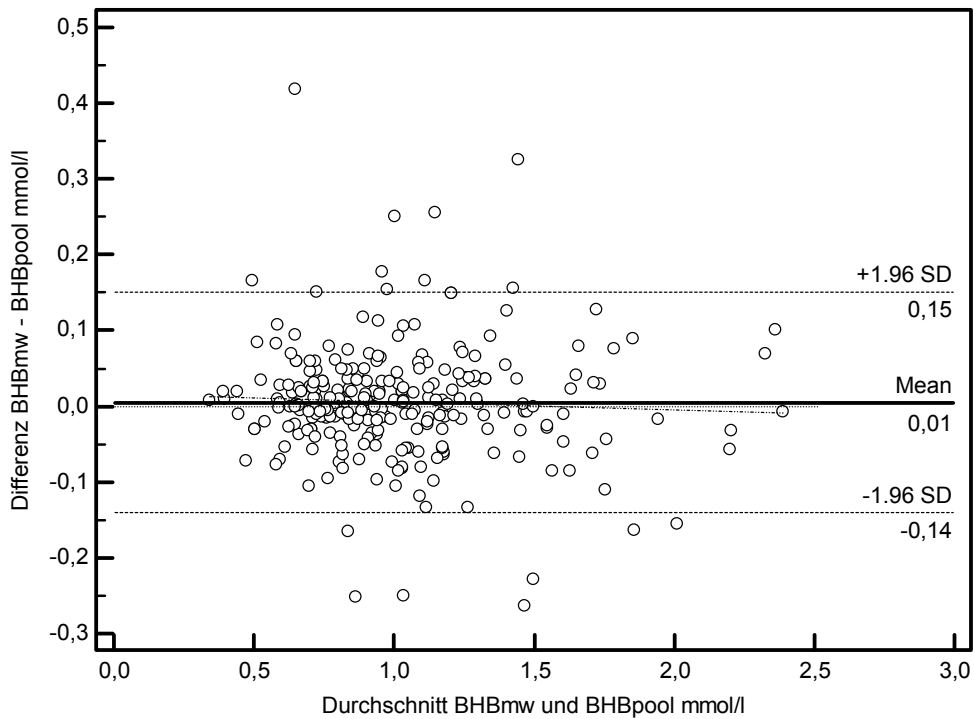


Abbildung 37: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der BHB mit der absoluten Differenz (n=278)

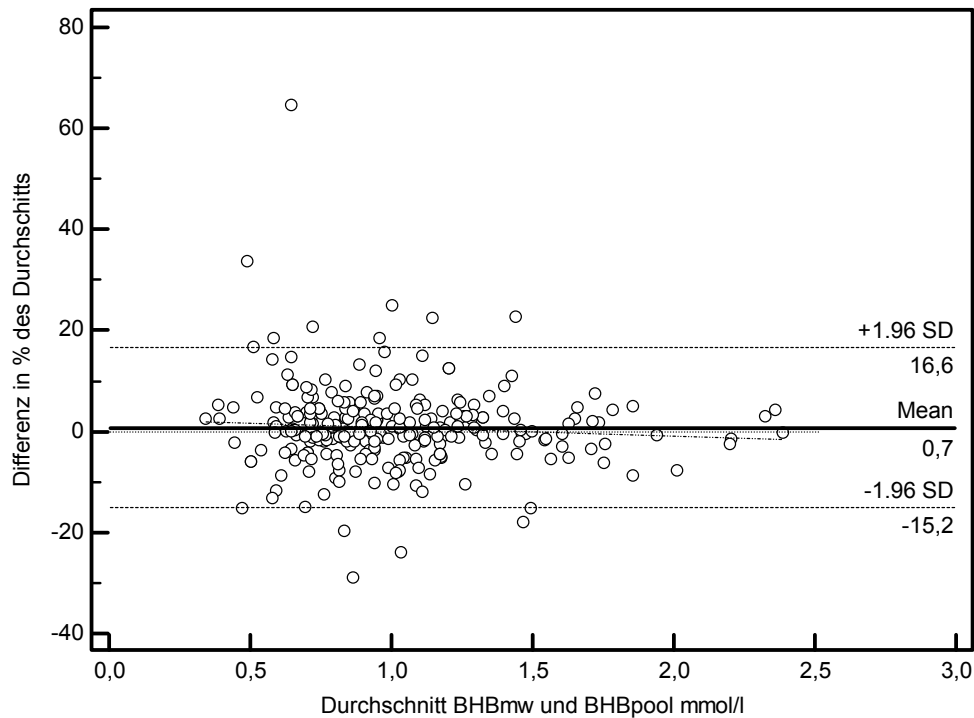


Abbildung 38: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der BHB mit der absoluten Differenz (n=278)

#### 4.4.6. Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und der Anzahl Tieren über dem Referenzwert in der Stichprobe

In diesem Abschnitt wurden nur die Herden (n=110) verwendet, welche eine Stichprobenanzahl von n=10 aufwiesen. Abbildung 39 zeigt ein Beispiel für die lineare Regressionsanalyse zwischen NEFA-Poolwert und der Anzahl an Tieren über dem Referenzwert von 0,8mmol NEFA/l. Die Gleichung der Regressionsgeraden mit dem Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ ) ist ebenfalls angegeben.

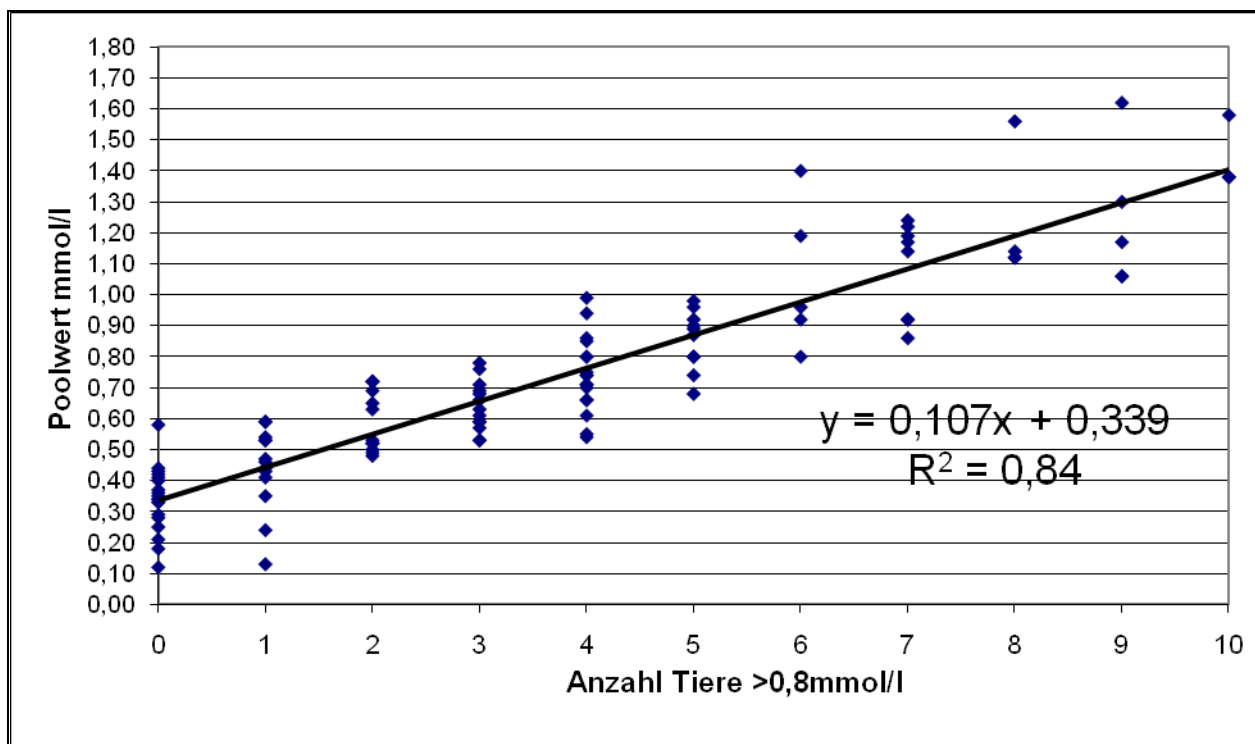


Abbildung 39: Beziehung zwischen dem NEFA-Poolwert und der Anzahl an Tieren >0,8mmol NEFA/l mit der entsprechenden Regressionsgeraden (n=110)

Die Tabellen 42 und 43 fassen die Ergebnisse der linearen Regressionsanalyse zusammen. Die Regressionsgeraden sind der Abbildung 39 entsprechend zu interpretieren.

Tabelle 42: Lineare Regressionsanalyse der NEFA bei den entsprechenden Referenzwerten für das Einzeltier (n=110)

Referenzwert	$R^2$	Anstieg $b^1$	95%-CI b		p	Konstante $a^1$	95%-CI a		p
			Untergrenze	Obergrenze			Untergrenze	Obergrenze	
<b>0,6mmol/l</b>	0,806	<b>0,100</b>	0,091	0,110	p<0,05	<b>0,205</b>	0,150	0,260	p<0,05
<b>0,8mmol/l</b>	0,842	<b>0,107</b>	0,098	0,115	p<0,05	<b>0,339</b>	0,299	0,378	p<0,05
<b>1,0mmol/l</b>	0,836	<b>0,123</b>	0,113	0,134	p<0,05	<b>0,428</b>	0,393	0,463	p<0,05
<b>1,2mmol/l</b>	0,732	<b>0,147</b>	0,130	0,164	p<0,05	<b>0,490</b>	0,448	0,531	p<0,05
<b>1,4mmol/l</b>	0,679	<b>0,185</b>	0,161	0,209	p<0,05	<b>0,538</b>	0,496	0,580	p<0,05

<sup>1</sup>  $Y = b \times X + a$ ; Y Poolwert ; X Anzahl an Tieren in der Stichprobe über dem Referenzwert



Tabelle 43: Lineare Regressionsanalyse der BHB bei den entsprechenden Referenzwerten für das Einzeltier (n=110)

Referenzwert	R <sup>2</sup>	Anstieg b <sup>1</sup>	95%-CI b		p	Konstante a <sup>1</sup>	95%-CI a		p
			Untergrenze	Obergrenze			Untergrenze	Obergrenze	
<b>1,0mmol/l</b>	0,647	<b>0,135</b>	0,116	0,154	p<0,05	<b>0,563</b>	0,492	0,634	p<0,05
<b>1,2mmol/l</b>	0,758	<b>0,174</b>	0,156	0,193	p<0,05	<b>0,642</b>	0,593	0,691	p<0,05
<b>1,4mmol/l</b>	0,739	<b>0,201</b>	0,179	0,224	p<0,05	<b>0,703</b>	0,657	0,750	p<0,05

<sup>1</sup> Y = b x X + a; Y Poolwert ; X Anzahl an Tieren in der Stichprobe über dem Referenzwert

Das Bestimmtheitsmaß (R<sup>2</sup>) ist für die NEFA im Allgemeinen höher als für die BHB. Das Bestimmtheitsmaß ist abhängig vom Referenzwert für das Einzeltier.

Der Anstieg der Regressionsgeraden (b) ist am Beispiel des NEFA-Referenzwertes von 0,8mmol/l wie folgt zu interpretieren: Erhöht sich die Anzahl an Tieren über dem Referenzwert um ein Tier, so steigt der Poolwert um 0,107mmol/l (95%-Konfidenzintervall 0,091 bis 0,110mmol/l).

Die Konstante (a) gibt den Poolwert an für den Fall, dass sich keine Tiere über dem Referenzwert in dem Pool befinden. Mit steigendem Referenzwert für das Einzeltier erhöht sich die Konstante, da der Anteil an Herden mit null Tieren über dem Referenzwert (x = 0) zunimmt.

#### 4.4.7. Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten und größten Einzelwert in der Stichprobe

In diesem Abschnitt wurden nur die Herden (n=110) verwendet, welche eine Stichprobenanzahl von n=10 aufwiesen. Die Ergebnisse der multiplen Regressionsanalyse sind in den Tabellen 44 und 45 zusammengefasst. Eine Voraussetzung für die Durchführung der multiplen Regressionsanalyse ist der Ausschluss der Kolinearität der unabhängigen Variablen. Die Korrelation nach Pearson zwischen dem kleinsten und dem größten Einzelwert der NEFA in der Stichprobe beträgt r = 0,57 (p < 0,01). Die Korrelation nach Pearson zwischen dem kleinsten und dem größten Einzelwert der BHB in der Stichprobe beträgt r = 0,33 (p < 0,05). Somit kann eine starke Kolinearität ausgeschlossen werden.

Die Korrelation nach Pearson zwischen dem NEFA-Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten NEFA-Einzelwert in der Stichprobe beträgt r = 0,75 (p < 0,01). Zu dem größten NEFA-Einzelwert in der Stichprobe beträgt diese r = 0,90 (p < 0,01). Die Korrelation nach Pearson zwischen dem BHB-Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten BHB-Einzelwert in der Stichprobe beträgt r = 0,53 (p < 0,01). Zu dem größten NEFA-Einzelwert in der Stichprobe beträgt diese r = 0,84 (p < 0,01).

Tabelle 44: Multiple Regressionsanalyse zum Einfluss des kleinsten (NEFAmin) und größten (NEFAmax) NEFA-Einzelwertes in der Stichprobe auf den NEFA-Poolwert (NEFApool) der Stichprobe (n=110)

Variable	Korrelation r			Regressionsmodell		
	NEFAmax	NEFAmin	NEFApool	$\beta$	$sr^2$	b
NEFAmin			0.75**	0.35**	0.08	0.60
NEFAmax		0.57**	0.90**	0.70**	0.32	0.40
				Konstante = 0,01		
Mittelwert	1,38	0,27	0,72			
Standardabw.	0,57	0,19	0,33		$R^2 = 0,88**$	

\*\* p < 0,01

Sowohl für die NEFA als auch für die BHB ist die Qualität des multiplen Regressionsmodells ( $R^2$ ) gut. Dementsprechend ist der Anteil der Variation vom Poolwert, der durch das Regressionsmodell erklärt wird, hoch. Bei Betrachtung des standardisierten Regressionskoeffizienten ( $\beta$ ) als Maß für den Einfluss auf die Vorhersage des Poolwertes in der Stichprobe fällt folgendes auf: Sowohl für die NEFA als auch für die BHB ist der Einfluss des größten Einzelwertes (max) in der Stichprobe auf den Poolwert größer gegenüber dem kleinsten Einzelwert (min) in der Stichprobe. Der standardisierte Regressionskoeffizient kann am Beispiel von NEFAmin wie folgt interpretiert werden: Bei Abweichung des kleinsten Einzelwertes der NEFA in der Stichprobe um eine Standardabweichung (0,19mmol/l) steigt der NEFA-Poolwert der Stichprobe um 0,35-Standardabweichungen ( $0,35 \times 0,33\text{mmol/l} = 0,114\text{mmol/l}$ ) bzw. um 0,114mmol/l, wenn der größte NEFA-Einzelwert konstant gehalten wird.

Tabelle 45: Multiple Regressionsanalyse zum Einfluss des kleinsten (BHBmin) und größten (BHBmax) BHB-Einzelwertes in der Stichprobe auf den BHB-Poolwert (BHBpool) der Stichprobe (n=110)

Variable	Korrelation r			Regressionsmodell		
	BHBmax	BHBmin	BHBpool	$\beta$	$sr^2$	b
BHBmin			0.53**	0.28**	0.07	0.67
BHBmax		0.33**	0.84**	0.74**	0.49	0.23
				Konstante = 0,19**		
Mittelwert	2,15	0,44	0,98			
Standardabw.	1,18	0,15	0,36		$R^2 = 0,76**$	

\*\* p < 0,01

Das Quadrat der semipartiellen Korrelation ( $sr^2$ ) beschreibt den Anteil der Varianz der abhängigen Variable (Poolwert) der in dem multiplen Regressionsmodell durch eine unabhängige Variable (Min oder Max) erklärt wird.

#### 4.4.8. Ermittlung von Referenzwerten für gepoolte Serumproben der NEFA und der BHB

Zur Ermittlung der Referenzwerte und zur Beschreibung des Zusammenhangs zwischen der NEFA und der BHB werden die 110 Herden bzw. Poolproben verwendet, welche eine Stichprobenzahl von 10 Tieren aufweisen.

##### 4.4.8.1. Definition einer Referenzpopulation an Hand des Anteils an gestörten Tieren in der Stichprobe

Die Definition der Herden beruht hier auf der Anzahl an Tieren in der Stichprobe über einem Einzeltierreferenzwert. Dies ist in Tabelle 46 zusammengefasst. Die Anzahl an Tieren über dem Referenzwert nimmt mit Steigerung des Referenzwertes bei den NEFA und der BHB ab.

Tabelle 46: Absoluter und relativer Anteil an Herden mit der entsprechenden Anzahl an Einzeltieren in der Stichprobe (n = 10) über verschiedenen Referenzwerten für das Einzeltier

Parameter	Referenzwert	Herden	Anzahl Tiere über dem Referenzwert										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
NEFA	0,6mmol/l	n	9	6	8	12	12	13	11	13	9	10	7
		%	8,2	5,5	7,3	10,9	10,9	11,8	10,0	11,8	8,2	9,1	6,4
NEFA	0,8mmol/l	n	19	13	13	13	17	10	5	8	4	5	3
		%	17,3	11,8	11,8	11,8	15,5	9,1	4,5	7,3	3,6	4,5	2,7
NEFA	1,0mmol/l	n	33	18	18	13	7	7	6	1	5	2	
		%	30,0	16,4	16,4	11,8	6,4	6,4	5,5	0,9	4,5	1,8	
NEFA	1,2mmol/l	n	46	23	12	13	7	5	1		3		
		%	41,8	20,9	10,9	11,8	6,4	4,5	0,9		2,7		
NEFA	1,4mmol/l	n	60	23	13	7	2	4			1		
		%	54,5	20,9	11,8	6,4	1,8	3,6			0,9		
BHB	1,0mmol/l	n	12	21	17	14	17	12	9	5	3		
		%	10,9	19,1	15,5	12,7	15,5	10,9	8,2	4,5	2,7		
BHB	1,2mmol/l	n	26	31	21	10	9	7	4	2			
		%	23,6	28,2	19,1	9,1	8,2	6,4	3,6	1,8			
BHB	1,4mmol/l	n	40	33	15	11	4	5	1	1			
		%	36,4	30,0	13,6	10,0	3,6	4,5	0,9	0,9			

Innerhalb einer Herde gibt es in der ersten Woche post partum signifikante Zusammenhänge zwischen der Anzahl an Tieren, die einen Einzeltierreferenzwert für die NEFA und die BHB übersteigen (Tab. 47). Befinden sich in einer Herde bei einer Stichprobengröße von 10 Tieren mehr als zwei Tiere mit NEFA-Werten  $>0,8\text{mmol/l}$ , dann sind die Chancen 3,95-mal so hoch, dass in derselben Stichprobe mehr als 2 Tiere mit BHB-Werten  $>1,4\text{mmol/l}$  sind. Bei einem NEFA-Grenzwert für das Einzeltier von  $1,0\text{mmol/l}$  sind die Chancen 2,55- bzw. 3,10-mal so hoch, dass sich in derselben Stichprobe mehr als 2 Tiere mit BHB-Werten  $>1,2\text{mmol/l}$  bzw.  $1,4\text{mmol/l}$  befinden. Bei einem NEFA-Grenzwert für

das Einzeltier von 1,2mmol/l sind die Chancen 2,65- bzw. 3,03-mal so hoch, dass sich in derselben Stichprobe mehr als 2 Tiere mit BHB-Werten >1,2mmol/l bzw. 1,4mmol/l befinden.

Tabelle 47: Zusammenhang zwischen den gestörten Herden (n=110), ausgedrückt als Odds Ratio<sup>1</sup>

Definition der Herden			BHB		
			> 2 Tiere 1,0mmol/l	> 2 Tiere 1,2mmol/l	> 2 Tiere 1,4mmol/l
NEFA	> 2 Tiere > 0,6mmol/l	Odds Ratio	2,20	2,25	3,13
		95% CI	0,86 - 5,64	0,70 - 7,25	0,68 - 14,53
		Chi <sup>2</sup>	0,095	0,165	0,128
	> 2 Tiere > 0,8mmol/l	Odds Ratio	1,71	2,19	<b>3,93</b>
		95% CI	0,80 - 3,69	0,90 - 5,33	1,23 - 12,54
		Chi <sup>2</sup>	0,167	0,081	<b>0,015</b>
	> 2 Tiere > 1,0mmol/l	Odds Ratio	1,78	<b>2,55</b>	<b>3,10</b>
		95% CI	0,81 - 3,94	1,10 - 5,93	1,18 - 8,09
		Chi <sup>2</sup>	0,150	<b>0,028</b>	<b>0,018</b>
	> 2 Tiere > 1,2mmol/l	Odds Ratio	1,85	<b>2,65</b>	<b>3,03</b>
95% CI		0,77 - 4,47	1,08 - 6,48	1,14 - 8,07	
Chi <sup>2</sup>		0,167	<b>0,030</b>	<b>0,023</b>	
> 2 Tiere > 1,4mmol/l	Odds Ratio	3,52	2,02	1,73	
	95% CI	0,92 - 13,40	0,64 - 6,38	0,49 - 6,16	
	Chi <sup>2</sup>	0,053	0,225	0,391	

<sup>1</sup> fett - Chi<sup>2</sup> p < 0,05

#### 4.4.8.2. Definition einer Referenzpopulation an Hand der Schiefe der Verteilungsfunktion der Poolproben

Zur Reduktion der Ausgangspopulation wird der Poolwert aus den Abbildungen 40 und 41 abgelesen, bei dem die Schiefe annähernd Null beträgt. Dieser Poolwert dient dann als maximale Begrenzung für die extrahierten Daten. Bei Verwendung der 110 Herden mit der Stichprobengröße von n = 10 beträgt dieser Poolwert für die NEFA 1,12mmol/l und für die BHB 1,21mmol/l. Die Referenzpopulation besteht nach diesem Verfahren für die NEFA aus 95 Herden und für die BHB aus 88 Herden.

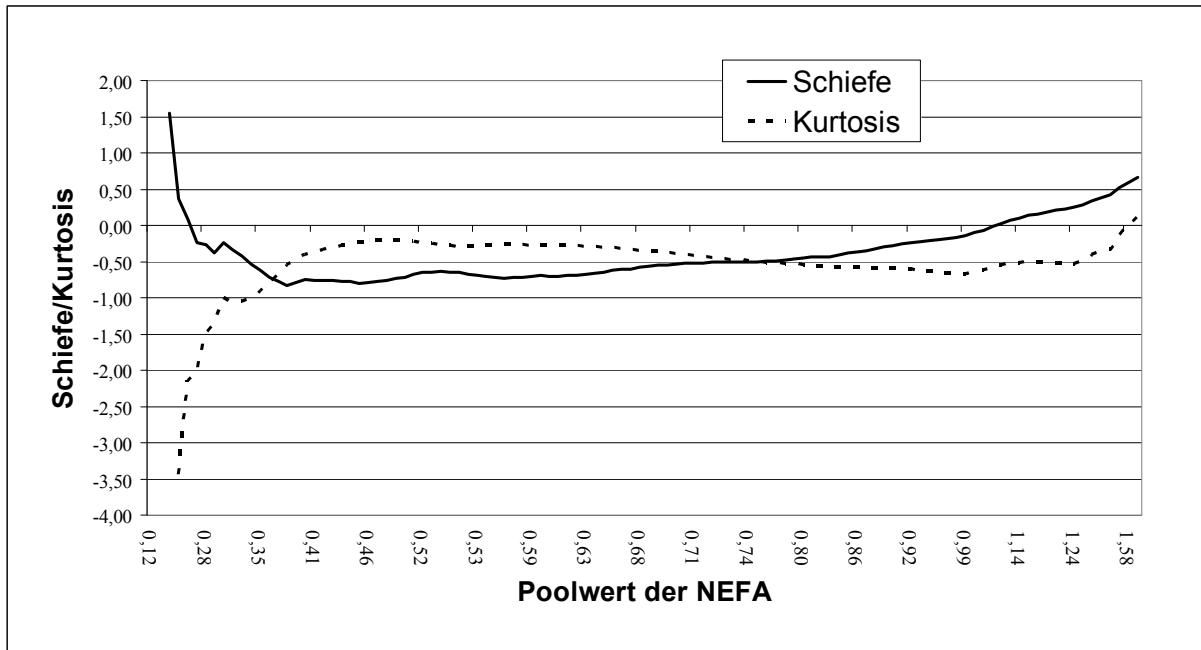


Abbildung 40: Schiefe und Kurtosis der NEFA in Abhängigkeit vom maximalen Poolwert in der Population; Ausgangspopulation 110 Herden

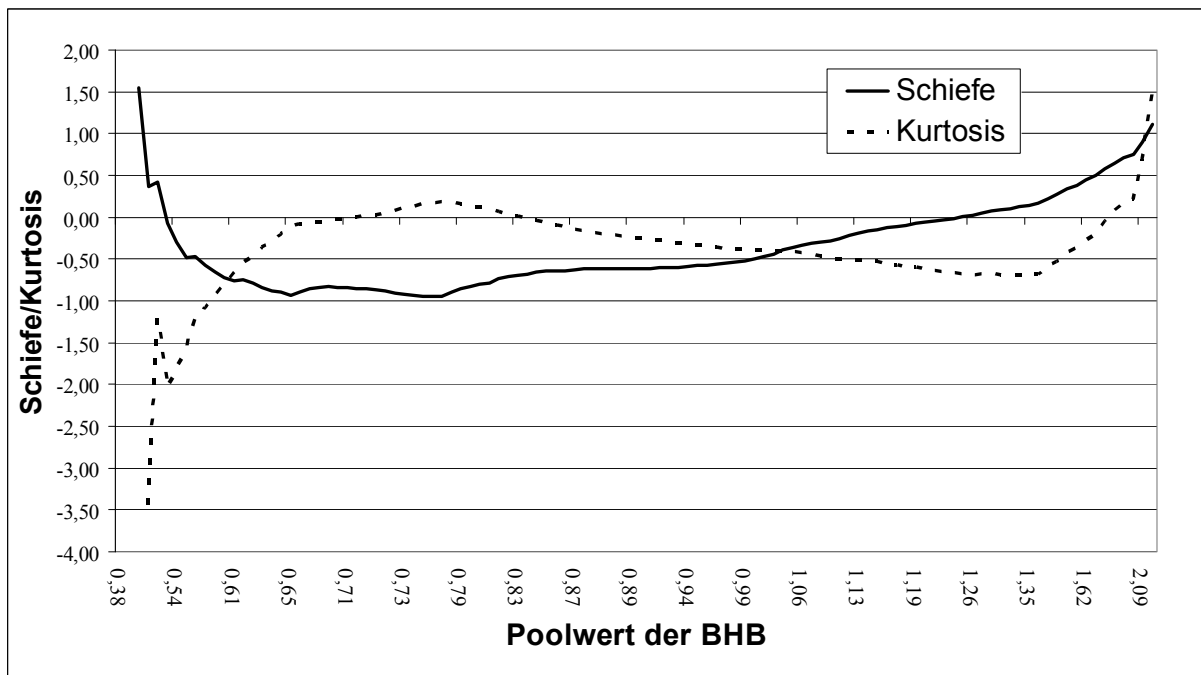


Abbildung 41: Schiefe und Kurtosis der BHB in Abhängigkeit vom maximalen Poolwert in der Population; Ausgangspopulation 110 Herden

#### **4.4.8.3. Anwendung von parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen zur Berechnung von Referenzwerten**

Die Tabellen 48 und 49 enthalten die deskriptive Statistik und die parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaße der Ausgangspopulation ( $n = 110$ ) und der entsprechenden Referenzpopulationen. Die Referenzpopulationen sind unterschiedlich groß. Sie bestehen aus der Referenzpopulation, die auf Grundlage der Schiefe der Verteilungsfunktion gebildet wurde und aus den ungestörten Herden. Die Definition der ungestörten Herden erfolgte an Hand der Einzeltiere in der Stichprobe ( $n = 10$ ), die über einem Einzeltierreferenzwert für die NEFA oder die BHB lagen. Für die NEFA wurden fünf (0,6 bis 1,4mmol NEFA/l) und für die BHB drei (1,0 bis 1,4mmol BHB/l) Einzeltierreferenzwerte herangezogen.

Sofern die Verteilungsfunktion der jeweiligen Herden einer Normalverteilung entspricht, sind die Unterschiede zwischen den parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen nur geringfügig.

Tabelle 48: Deskriptive Statistik, parametrische und nicht-parametrische Streuungsmaße verschiedener Verteilungsfunktionen von gepoolten Serumproben der NEFA

Parameter	110 Poolwerte mit n = 10	Herden max. Pool 1,12mmol/l und n = 10	ungestörte Herden mit 0,6mmol/l	ungestörte Herden mit 0,8mmol/l	ungestörte Herden mit 1,0mmol/l	ungestörte Herden mit 1,2mmol/l	ungestörte Herden mit 1,4mmol/l
<b>Kommentar</b>	alle Herden mit einer Stichprobengröße von n = 10	Annäherung an die Normalverteilung mit Schiefe = 0	null Tiere mit NEFA >0,6mmol/l in der Stichprobe bei n = 10	null Tiere mit NEFA >0,8mmol/l in der Stichprobe bei n = 10	null Tiere mit NEFA >1,0mmol/l in der Stichprobe bei n = 10	null Tiere mit NEFA >1,2mmol/l in der Stichprobe bei n = 10	null Tiere mit NEFA >1,4mmol/l in der Stichprobe bei n = 10
<b>n</b>	110	95	9	19	33	46	60
<b>Mittelwert</b>	0,72	0,62	0,27	0,34	0,40	0,45	0,50
<b>s</b>	0,33	0,23	0,10	0,11	0,14	0,16	0,18
<b>Median</b>	0,68	0,61	0,28	0,34	0,41	0,44	0,52
<b>IQ 25%-75%</b>	0,49 - 0,92	0,44 - 0,80	0,20 - 0,33	0,28 - 0,41	0,33 - 0,52	0,34 - 0,55	0,36 - 0,62
<b>Schiefe</b>	0,66	0,03	0,17	-0,02	-0,23	-0,09	0,10
<b>p<sup>1</sup></b>	p < 0,05	0,905	0,807	0,963	0,553	0,788	0,74
<b>Kurtosis</b>	0,13	-0,55	0,17	0,90	-0,38	-0,48	-0,09
<b>p<sup>2</sup></b>	0,639	0,246	0,755	0,303	0,486	0,383	0,71
<b>p<sup>3</sup></b>	0,333	0,978	0,998	0,730	0,951	0,883	0,884
<b>k = 1,96</b>							
<b><math>\bar{x} \pm 1,96s</math></b>	0,06 - 1,37	0,16 - 1,08	0,07 - 0,47	0,12 - 0,56	0,13 - 0,67	0,14 - 0,76	0,15 - 0,85
<b>2,5% bis 97,5%</b>	0,17 - 1,56	0,15 - 1,10	0,12 - 0,44	0,12 - 0,58	0,12 - 0,66	0,12 - 0,73	0,13 - 0,92
<b>k = 1</b>							
<b><math>\bar{x} \pm 1s</math></b>	0,39 - 1,04	0,39 - 0,85	0,17 - 0,37	0,23 - 0,45	0,26 - 0,54	0,29 - 0,61	0,32 - 0,68
<b>16% bis 84%</b>	0,41 - 1,07	0,36 - 0,88	0,16 - 0,38	0,22 - 0,43	0,26 - 0,54	0,29 - 0,60	0,33 - 0,68

<sup>1</sup> Signifikanzniveau der Schiefe

<sup>2</sup> Signifikanzniveau der Kurtosis

<sup>3</sup> Signifikanzniveau des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung

Tabelle 49: Deskriptive Statistik, parametrische und nicht-parametrische Streuungsmaße verschiedener Verteilungsfunktionen von gepoolten Serumproben der BHB

Parameter	110 Poolwerte mit n = 10	Herden max. Pool 1,21mmol/l und n = 10	ungestörte Herden mit 1,0mmol/l	ungestörte Herden mit 1,2mmol/l	ungestörte Herden mit 1,4mmol/l
<b>Kommentar</b>	alle Herden mit einer Stichprobengröße von n = 10	Annäherung an die Normalverteilung mit Schiefe = 0	null Tiere mit BHB >1,0mmol/l in der Stichprobe bei n = 10	null Tiere mit BHB >1,2mmol/l in der Stichprobe bei n = 10	null Tiere mit BHB >1,4mmol/l in der Stichprobe bei n = 10
<b>n</b>	<b>110</b>	<b>88</b>	<b>12</b>	<b>26</b>	<b>40</b>
<b>Mittelwert</b>	0,98	0,84	0,58	0,65	0,71
<b>s</b>	0,36	0,21	0,13	0,14	0,16
<b>Median</b>	0,89	0,85	0,60	0,65	0,71
<b>IQ<sub>25%-75%</sub></b>	0,72 - 1,17	0,69 - 0,99	0,50 - 0,66	0,58 - 0,74	0,60 - 0,82
<b>Schiefe</b>	1,12	-0,03	0,03	0,18	0,17
<b>p<sup>1</sup></b>	p < 0,05	0,9122	0,966	0,672	0,623
<b>Kurtosis</b>	1,51	-0,66	-0,55	0,42	-0,04
<b>p<sup>2</sup></b>	p < 0,05	0,199	0,51	0,486	0,775
<b>p<sup>3</sup></b>	0,105	0,819	1,000	0,989	1,000
<b>k = 1,96</b>					
<b><math>\bar{x} \pm 1,96s</math></b>	0,25 - 1,70	0,42 - 1,26	0,33 - 0,83	0,38 - 0,92	0,40 - 1,02
<b>2,5% bis 97,5%</b>	0,43 - 1,87	0,40 - 1,21	0,38 - 0,81	0,38 - 0,99	0,38 - 1,06
<b>k = 1</b>					
<b><math>\bar{x} \pm 1s</math></b>	0,62 - 1,34	0,63 - 1,05	0,45 - 0,71	0,51 - 0,79	0,55 - 0,87
<b>16% bis 84%</b>	0,65 - 1,31	0,63 - 1,07	0,40 - 0,74	0,52 - 0,78	0,55 - 0,87

<sup>1</sup> Signifikanzniveau der Schiefe

<sup>2</sup> Signifikanzniveau der Kurtosis

<sup>3</sup> Signifikanzniveau des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf Normalverteilung



#### 4.4.8.4. ROC-Kurvenanalyse

Abbildung 42 zeigt das Beispiel einer ROC-Kurve mit dem NEFA-Poolwert als Variable. Der kreisförmige Punkt auf der Kurve markiert den Punkt mit den besten diagnostischen Eigenschaften (hier 0,49mmol/l bei einer Sensitivität von 92,0% und einer Spezifität von 85,7%) und liegt definitionsgemäß der linken oberen Ecke am nächsten. Die Fläche unter der Kurve beträgt hier 0,96.

Die Fläche unter der ROC-Kurve (Area under curve: AUC) ist ein Maß für die gesamte Genauigkeit des Tests. Diese kann hier wie folgt interpretiert werden: eine Fläche von 0,96 bedeutet, dass der Poolwert der NEFA einer zufällig ausgewählten Herde aus der gestörten Population zu 96% größer ist als der Poolwert einer zufällig ausgewählten Herde aus der verdächtigen Population (Zweig und Campbell 1993).

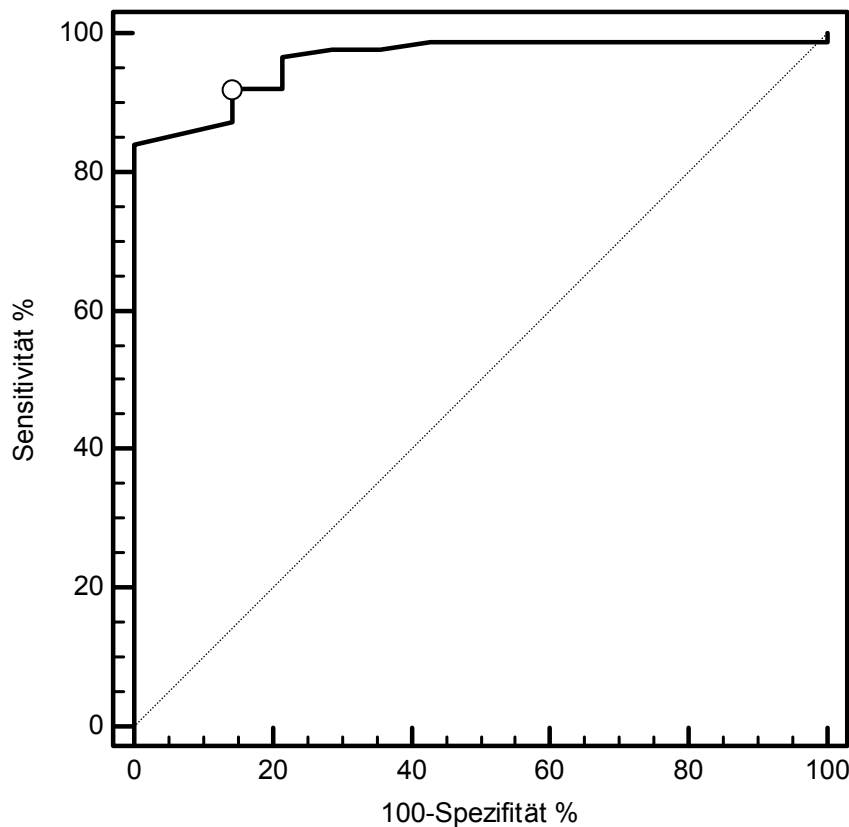


Abbildung 42: ROC-Kurvenanalyse zur Trennung verdächtiger und gestörter Herden; Verdächtig (1 bis 2 Tiere >0,6mmol NEFA/l) vs. Gestört ( $\geq 3$  Tiere >0,6mmol NEFA/l); AUC = 0,96; empfohlener Cutpoint = 0,49mmol NEFA/l

Die Tabellen 50 und 51 fassen die Ergebnisse der ROC-Kurvenanalyse zusammen. Der prozentuale Anteil an Herden über dem Cutpoint (scheinbare Prävalenz) bezieht sich auf die 110 Herden, die in die ROC-Kurvenanalyse eingegangen sind.

Die Abbildungen 43 und 44 zeigen exemplarisch die positiven und negativen prädiktiven Werte in Abhängigkeit von der Prävalenz der kranken Herden. Sie beziehen sich auf die diagnostischen

Eigenschaften (Se und Sp) der Cutpoints der NEFA (bei 0,8mmol/l) und der BHB (bei 1,2mmol/l) zur Trennung zwischen verdächtigen und kranken Herden.

Tabelle 50: Cutpoints der NEFA-Poolwerte zur Trennung zwischen den Herden im Sinne der Definition mit den entsprechenden diagnostischen Eigenschaften

Parameter Referenz	Vergleich der Populationen (n Herden)	AUC	Cutpoint mmol/l	Anteil Herden über dem Cutpoint %	Se %	Sp %
NEFA >0,6mmol/l	Gesund (9) vs Verdächtig (14)	0,86	<b>0,34</b>	90,91	78,6	88,9
	Verdächtig (14) vs Krank (87)	0,96	<b>0,49</b>	75,45	92,0	85,7
NEFA >0,8mmol/l	Gesund (19) vs Verdächtig (26)	0,87	<b>0,44</b>	80,00	76,9	94,7
	Verdächtig (26) vs Krank (65)	0,93	<b>0,65</b>	54,55	84,6	84,6
NEFA >1,0mmol/l	Gesund (33) vs Verdächtig (36)	0,90	<b>0,48</b>	75,45	91,7	72,7
	Verdächtig (36) vs Krank (41)	0,91	<b>0,78</b>	36,36	85,4	88,9
NEFA >1,2mmol/l	Gesund (46) vs Verdächtig (35)	0,90	<b>0,59</b>	58,18	80,0	84,8
	Verdächtig (35) vs Krank (29)	0,97	<b>0,85</b>	30,00	100,0	88,6
NEFA >1,4mmol/l	Gesund (60) vs Verdächtig (36)	0,92	<b>0,66</b>	53,63	88,9	83,3
	Verdächtig (36) vs Krank (14)	0,92	<b>1,06</b>	15,45	92,9	88,9

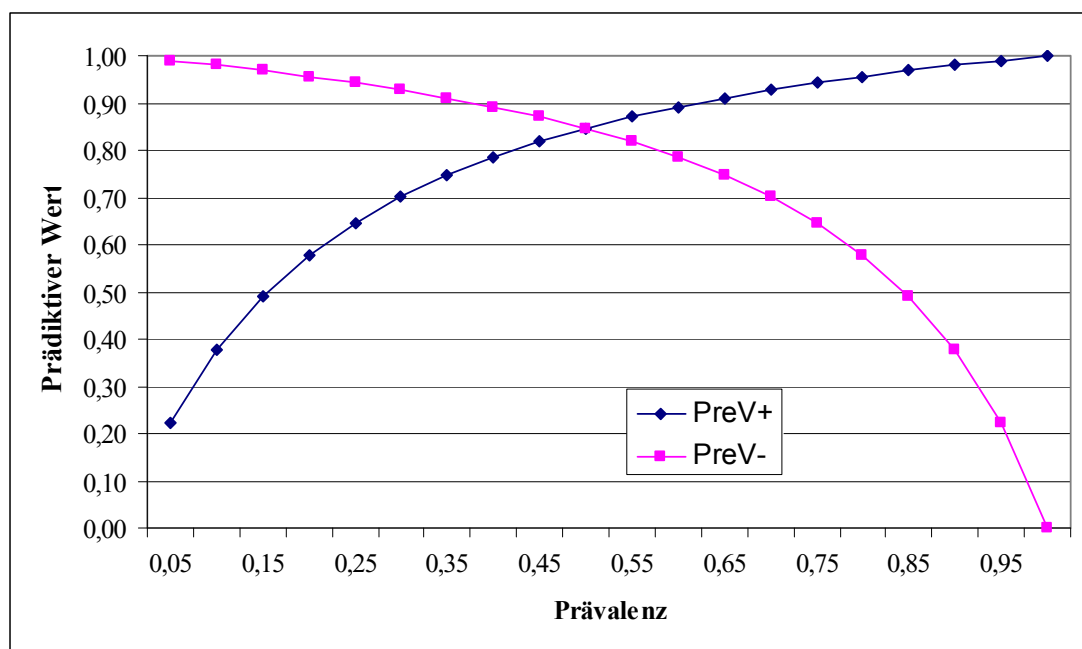


Abbildung 43: Prädiktive Werte (PreV+ positiver prädiktiver Wert; PreV- negativer prädiktierter Wert) des Cutpoints der NEFA zur Trennung zwischen Verdächtig und Krank (0,8mmol/l; Se 84,6%; Sp 84,6%) in Abhängigkeit von der Prävalenz

Tabelle 51: Cutpoints der BHB-Poolwerte zur Trennung zwischen den Herden im Sinne der Definition mit den entsprechenden diagnostischen Eigenschaften

Parameter Referenz	Vergleich der Populationen (n Herden)	AUC	Cutpoint mmol/l	Anteil Herden über dem Cutpoint %	Se %	Sp %
BHB >1,0mmol/l	Gesund (12) vs Verdächtig (38)	0,82	<b>0,68</b>	82,73	76,3	83,3
	Verdächtig (38) vs Krank (60)	0,91	<b>0,85</b>	56,36	90,0	79,0
BHB >1,2mmol/l	Gesund (26) vs Verdächtig (52)	0,85	<b>0,75</b>	70,00	76,9	84,6
	Verdächtig (52) vs Krank (32)	0,97	<b>1,10</b>	30,91	90,6	92,3
BHB >1,4mmol/l	Gesund (40) vs Verdächtig (48)	0,84	<b>0,84</b>	60,00	77,1	82,5
	Verdächtig (48) vs Krank (22)	0,92	<b>1,18</b>	23,64	86,3	85,4

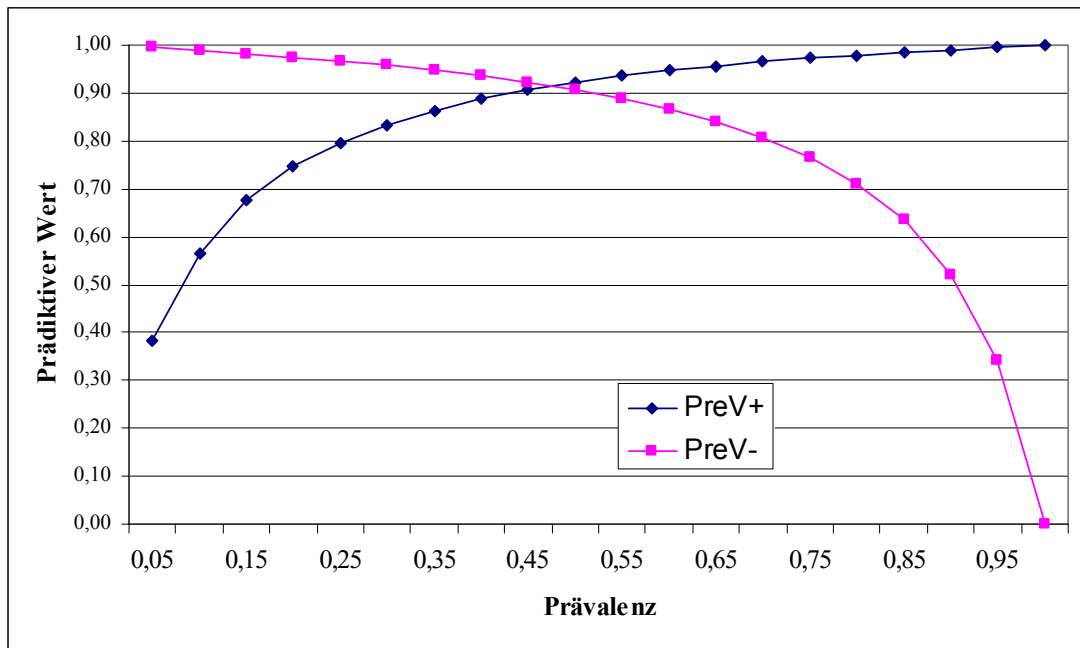


Abbildung 44: Prädiktive Werte (PreV+ positiver prädiktiver Wert; PreV- negativer prädiktiver Wert) des Cutpoints der BHB zur Trennung zwischen Verdächtig und Krank (1,2mmol/l; Se 90,6%; Sp 92,3%) in Abhängigkeit von der Prävalenz

## **5. Diskussion**

### **5.1. Untersuchung zum Einfluss präanalytischer Variablen auf die labordiagnostischen Ergebnisse der NEFA und BHB beim Rind**

Präanalytische Fehlerquellen stellen ein Problem für die Qualität der Labordiagnostik in der Rinderpraxis dar. Unter praktischen Bedingungen kann nur in den seltensten Fällen im Anschluss an die Probenentnahme eine sofortige Probenverarbeitung und -analyse durchgeführt werden, wie es unter Klinikbedingungen möglich ist. Ziel dieser Untersuchung sollte es sein, den Einfluss von praxisrelevanten präanalytischen Faktoren auf die Bestimmung der NEFA und der BHB zu beschreiben.

Die Tiefgefrierung des Serums führte gegenüber der Lagerung im Kühlschrank zu einer geringfügigen Konzentrationserniedrigung der NEFA (-0,04mmol/l) und der BHB (-0,02mmol/l; Tab. 20). Dies kann aus praktischer Sicht vernachlässigt werden. In anderen Untersuchungen hatte die Lagerung der Proben bei -20°C ebenfalls keinen klinisch relevanten Einfluss auf die Bestimmung der NEFA und der BHB im bovinen Serum bis zu 28 Tagen (Stokol und Nydam 2005). Im ovinen Plasma konnte kein klinisch relevanter Einfluss bis zu 180 Tagen nachgewiesen werden (Morris et al. 2002). In der eigenen Untersuchung wurde daher in allen weiteren präanalytischen Abschnitten vorausgesetzt, dass die Tiefgefrierung des Serums nach Untersuchung des Einflusses verschiedener Lagerungszustände und -bedingungen keinen bzw. einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Ausprägung der NEFA und der BHB hat.

In unzentrifugierten Proben können Wechselwirkungen zwischen den Zellen und dem Serum stattfinden, die die Zusammensetzung des Serums beeinflussen. In der Praxis werden Blutproben daher gekühlt und/oder zentrifugiert, um sie zu konservieren (Schulze 2008). Durch die Kühlung werden Stoffwechselprozesse in der Blutprobe verlangsamt oder unterbunden. Beim Zentrifugieren der Blutproben wird das Serum von den lebenden Zellen getrennt, weshalb keine Stoffwechselprozesse mehr ablaufen können (Kraft und Dürr 2005). Im Serum können dann nur noch Wechselwirkungen zwischen den Inhaltsstoffen des Serums, dem Röhrchenmaterial oder äußeren Faktoren stattfinden.

Die Lagerung des Serum-, EDTA- oder Heparin-Vollblutes für 24 Stunden bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank führte im Vergleich zur sofortigen Zentrifugation zu keinen signifikanten Abweichungen der NEFA und der BHB (Tab. 25). Für die Bestimmung der NEFA und der BHB wird auch von anderen Autoren eine Lagerungsstabilität von gekühltem bovinen Vollblut mit wenigstens 24 Stunden angegeben (Brenner und Reinhard 1976; Stokol und Nydam 2005; Ehsani et al. 2008). Die Angaben zur Lagerungsstabilität ungekühlter Vollblutproben sind sehr heterogen und reichen von vier (Schulze 2008) bis 48 Stunden (Whitaker 1996) für die NEFA und vier (Schulze 2008) bis 24 Stunden (Stokol und Nydam 2005; Ehsani et al. 2008) für die BHB. Die ungekühlte Lagerung von bovinem

Vollblut führte zu einer Erhöhung der NEFA nach 12 (Ehsani et al. 2008) bzw. 24 Stunden (Stokol und Nydam 2005). Der Anstieg der NEFA im ungekühlten Vollblutproben ist womöglich das Resultat einer spontanen und/oder Enzym-katalysierten Hydrolyse von veresterten Fetten (McGann und Hodson 1991). Mit Ausnahme der Untersuchung von Schulze (2008) war die Lagerungsstabilität der BHB in den Untersuchungen zur Lagerung von ungekühltem Vollblut (Stokol und Nydam 2005; Ehsani et al. 2008) größer gegenüber den NEFA. Obwohl es in der eigenen Untersuchung zu keinen signifikanten Abweichungen für die NEFA und die BHB bei der Lagerung von Vollblut im gekühlten oder ungekühlten Zustand kam, sei darauf hingewiesen, dass die Übereinstimmungsgrenzen für die ungekühlten Proben gegenüber den gekühlten weiter waren. Die Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren (Stokol und Nydam 2005; Schröder und Staufenbiel 2006a; Ehsani et al. 2008; Schulze 2008) insofern überein, als dass die Lagerung der Vollblutproben im Kühlschrank einen positiven Einfluss auf die Lagerungsstabilität hat.

Die Lagerung von zentrifugiertem Serum im ungekühlten Zustand für 24 Stunden und gekühlten Zustand für sieben Tage führte bis auf wenige Ausnahmen zu keinen signifikanten Abweichungen für die NEFA und die BHB (Tab. 21 und 22). Die Übereinstimmungsgrenzen waren zu allen Untersuchungszeitpunkten ausreichend eng und nicht von klinischer Relevanz. Demzufolge scheint eine Lagerungsstabilität für die NEFA und die BHB im bovines Serum im ungekühlten Zustand für wenigstens 24 Stunden und im gekühlten Zustand für wenigstens eine Woche gegeben zu sein. Stokol und Nydam (2005) geben für die NEFA eine Lagerungsstabilität des Serums von 24 Stunden im ungekühlten und von wenigstens drei Tagen im gekühlten Zustand an. Dieselben Autoren geben für die BHB eine Lagerungsstabilität von wenigstens drei Tagen an, unabhängig von der Lagerungstemperatur. Im ovines (Morris et al. 2002) und humanen (Gleeson 1987; Menendez et al. 2001) Serum konnte eine Erhöhung der NEFA-Konzentration beobachtet werden, was auf die Aktivität der Serumlipase zurückgeführt wird. Dies konnte in der eigenen Untersuchung nicht beobachtet werden.

Die Verwendung der Antikoagulanzen Heparin und EDTA führte zu signifikant erniedrigten NEFA- und BHB-Konzentrationen im Plasma (Tab. 23). Gelfert und Staufenbiel (1998) konnten dies für die BHB bei der Verwendung von EDTA bestätigen. Stokol und Nydam (2005) konnten keine signifikanten Unterschiede für die NEFA und die BHB bei der Verwendung von EDTA und Heparin gegenüber dem Serum feststellen, solange die Proben innerhalb von 24 Stunden zentrifugiert und zu jedem Zeitpunkt bei einer Temperatur von 4°C gelagert wurden. Die Lagerung der Heparin-Plasmaproben bei 24°C für 72 Stunden führte in derselben Untersuchung zu einem Anstieg der NEFA um 62%. Allerdings war das basale Niveau der NEFA in dieser Untersuchung sehr gering (Steigerung von 0,21 auf 0,34mmol NEFA/l). Zu keinem Zeitpunkt kam es zu klinischen Fehlinterpretationen auf Grund der Lagerungsbedingungen (Stokol und Nydam 2005). Heparin aktiviert die Lipoprotein-Lipase. Dieses Enzym befindet sich am kapillären Endothel und wird freigesetzt nach einem intravenösen Bolus von Heparin (Watson et al. 1995). Eine in-vitro Konzentrationserhöhung von

Heparin in humanen Plasmaproben bei einer Lagerung für 2h bei 4°C führte zu keiner Erhöhung der NEFA (Rogiers 1978).

Der Blutprobenentnahmeort hatte in der eigenen Untersuchung einen signifikanten Einfluss auf die Konzentration der NEFA und der BHB (Tab. 24). Die Konzentration der NEFA (-0,14mmol/l) und der BHB (-0,2mmol/l) war bei Punktion der V. epigastrica cranialis superficialis deutlich niedriger. Auch nach Ausschluss des Ausreißers bei der BHB waren die Ergebnisse immer noch signifikant. Redetzky et al. (2003) konnten für die BHB (-0,09mmol/l) vergleichbare Ergebnissen produzieren. Bei den NEFA konnten diese Autoren keine Unterschiede feststellen. Dies lag vermutlich an den geringen Ausgangskonzentrationen der NEFA (0,13mmol/l). Eine Erklärung bietet die Physiologie der Laktogenese. Das Eutergewebe ist in der Lage, die NEFA und die BHB zur Milchfettsynthese und zur Energiegewinnung zu nutzen (Kronfeld et al. 1968). Die Nettoaufnahme des Euters für die Metaboliten NEFA und BHB ist direkt abhängig von der Plasmakonzentration und weniger von der Biosyntheseleistung des Euters (Miller et al. 1991). Für die NEFA besteht eine lineare Beziehung zwischen der arteriellen Plasmakonzentration und der arterio-venösen Differenz (A. caudalis mediana und V. epigastrica cranialis superficialis). Dabei kommt es erst bei einer Konzentration > 0,35mmol NEFA/l zu einer Nettoaufnahme durch das Euter. Für die BHB existiert eine sigmoidale Beziehung. Bei einer BHB-Konzentration von 2mmol/l kam es zu einer Sättigung der Nettoaufnahme durch das Euter (Miller et al. 1991).

Bezüglich der Punktion der V. jugularis externa konnten nur für die BHB (-0,08mmol/l) signifikant geringere Konzentrationen gegenüber der A. oder V. caudalis mediana nachgewiesen werden. Obwohl die mittleren Konzentrationen der NEFA sich nicht signifikant unterschieden, deuten die weiten Übereinstimmungsgrenzen (-0,2mmol/l und 0,32mmol/l) darauf hin, dass es klinisch relevante Unterschiede zwischen der Blutentnahme aus der V. jugularis externa und der A. oder V. caudalis mediana gibt. Für die NEFA ist bereits beschrieben, dass es durch Zwangsmaßnahmen und dem daraus resultierenden Stress zu einer Catecholamin-induzierten Lipolyse kommen kann (Brickner et al. 2007). Möglicherweise hat aber auch der Gehalt an arteriellem oder arterio-venösen Mischblut aus der A. oder V. caudalis mediana einen Einfluss auf die Konzentration der BHB und der NEFA. Hierzu liegen keine Untersuchungen vor. Zur Blutprobenentnahme für die Stoffwechselüberwachung beim Rind wird daher die Punktion der A. oder V. caudalis mediana empfohlen (LeBlanc 2006; Oetzel 2007).

Aus diagnostischer Sicht leiten sich aus den eigenen Ergebnissen und aus der Literatur folgende Empfehlungen ab (Tab. 52): (1) die Blutprobenentnahme sollte möglichst stressfrei erfolgen, (2) die Blutentnahme aus der V. epigastrica cranialis superficialis sollte vermieden werden, (3) zur Blutentnahme sollten Serum-Röhrchen verwendet werden, (4) im Anschluss an die Blutentnahme und nach Abschluss der Gerinnung sollten die Proben kühl gelagert werden, (5) sollten die Proben nicht innerhalb von 24 Stunden analysiert werden, hat die Zentrifugation einen positiven Einfluss auf die Lagerungsstabilität und (6) die Tiefgefrierung von Serum hat keinen klinisch relevanten Einfluss auf die Bestimmung der NEFA und der BHB.

Tabelle 52: Empfehlungen zur Minimierung präanalytischer Einflussfaktoren bei der Verwendung der NEFA und der BHB in der Stoffwechselüberwachung

Einflussfaktor	Empfehlungen	Bedeutung <sup>1</sup> bei	
		NEFA	BHB
Blutprobenentnahme	unnötigen Stress vermeiden	+++	
Entnahmeort	Blutprobenentnahme aus der V. epigastrica cranialis spf. (Eutervene) vermeiden	+++	+++
Zeitpunkt der Zentrifugation	möglichst schnell nach der Entnahme; Stabilität des Vollblutes abhängig von der Lagerungstemperatur		
	Stabilität bei ungekühlter Lagerung ca. 12h	++	
	Stabilität bei gekühlter Lagerung ca. 24h	++	
Lagerung des Serums	Stabilität des Serums abhängig von der Lagerungstemperatur		
	Stabilität bei ungekühlter Lagerung mind. 24h	+	
	Stabilität bei gekühlter Lagerung ca. 7d	+	
Antikoagulanz	Serum (oder EDTA-Plasma) verwenden	++	+
	Heparin vermeiden	++	+
Tiefgefrierlagerung von Serum	ohne Probleme möglich		

<sup>1</sup> + geringfügiger ++ moderater +++ starker Einflussfaktor

## 5.2. Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode

Die TMR-Fütterung von Milchkühen ist weit verbreitet (Beauchemin et al. 2002). Die Vorlage von frischem Futter erfolgt ein- bis zweimal täglich und resultiert in einer Steigerung der Fressaktivität (DeVries et al. 2003). In diesem Zusammenhang kommt es zu Veränderungen im Pansenmilieu und demzufolge zu Variationen in der Konzentration von Blutmetaboliten (Blum et al. 2000). Ziel der Untersuchung sollte es sein, diese Variationen für die NEFA und die BHB in der Transitperiode unter den Bedingungen der einmaligen TMR-Futtermahlzeit in einer Hochleistungsherde zu beschreiben und mögliche Empfehlungen für die Diagnostik abzuleiten.

Die Konzentration der NEFA nahm in beiden Versuchsabschnitten nach der ersten Futtermahlzeit ab (Abb. 22 und 24). Die Ausprägung war in der Früh-laktation deutlicher und konnte nur hier statistisch gesichert werden (Tab. 30). Vom Grundsatz ist dieses Verhalten der NEFA in Übereinstimmung mit anderen Autoren (Nielsen et al. 2003; Plaizier et al. 2005; Bradford und Allen 2008; Wylie et al. 2008). Die Abnahme der NEFA beruht auf einer erhöhten Insulinausschüttung und der Begrenzung der Lipolyse. Die vermehrte Futteraufnahme nach der ersten Futtermahlzeit führt zu einer Aktivierung der Pansenfermentation und anschließender Resorption von kurzkettigen Fettsäuren (Acetat, Butyrat und Propionat). Propionat ist hierbei der zentrale Stimulus für die Insulinfreigabe (Bradford et al. 2006).



In der letzten Woche a.p. konnte in dieser Untersuchung kein signifikanter Effekt der Tageszeit für die NEFA nachgewiesen werden (Tab. 27). Die Konzentration der NEFA hat zwar nach der Fütterung abgenommen (von 0,19mmol NEFA/l auf 0,12mmol NEFA/l), jedoch konnte dies nicht statistisch gesichert werden. Lediglich die beiden Tiere mit der höchsten NEFA-Konzentration (Kuh 2 und 6; Abb. 22) vor der ersten Futtevorlage zeigten eine deutliche tageszeitliche Variation. Obwohl es sich hierbei um klinisch gesunde Tiere handelte, kann eine subklinische Stoffwechselstörung nicht ausgeschlossen werden.

In einer anderen Untersuchung sanken die NEFA in der letzten Woche a.p. von 0,3mmol/l auf 0,1mmol/l innerhalb von 8 Stunden nach der ersten Futtevorlage (Plaizier et al. 2005).

In der Frühlaktation war die größte signifikante Differenz zwischen dem Zeitpunkt 10 Uhr und 14 Uhr (-0,4mmol NEFA/l) bzw. 18 Uhr (-0,52mmol NEFA/l). Vergleichbare Ergebnisse konnten Plaizier et al. (2005) produzieren. In der ersten Woche p.p. sanken die NEFA hier von 1,0mmol/l auf 0,6mmol/l innerhalb von 8 Stunden nach der ersten Futtevorlage. Eine ausgeprägte Tagesdynamik der NEFA ist ebenfalls zu beobachten bei diskontinuierlicher Futtevorlage (Bradford und Allen 2008), kurzzeitigem Fasten (Chelikani et al. 2004) und Komponentenfütterung (Sutton et al. 1988; Bitman et al. 1990).

Obwohl die untersuchten Tiere in der Frühlaktation, mit Ausnahme des Melkvorgangs, zu jedem Zeitpunkt Zugang zum Futter hatten, hatte die Vorlage der frischen TMR-Ration einen deutlichen Einfluss auf die Fressaktivität und den Stoffwechsel der NEFA. Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass es bei Tieren mit subklinischen Stoffwechselstörungen bzw. einem höheren basalen NEFA-Niveau zu großen tageszeitlichen Schwankungen kommen kann. Zumindest in der Frühlaktation liegen die Schwankungen in einem Bereich, in dem es bei Verwendung des Mittel- oder Poolwertes einer Stichprobe von n=10 zur Stoffwechselüberwachung zu Fehlinterpretationen hätte kommen können.

Die Konzentration der BHB nahm in beiden Versuchsabschnitten nach der ersten Futtevorlage zu (Abb. 23 und 25). Dies deckt sich mit den Beobachtungen anderer Autoren (Nielsen et al. 2003; Plaizier et al. 2005; Bradford und Allen 2008; Ametaj et al. 2009). Ursache für dieses Verhalten der BHB ist die Resorption von Butyrat und anschließende Umwandlung zur BHB im Pansenepithel (Nielsen et al. 2003).

Die Konzentrationsunterschiede der BHB zwischen den Untersuchungszeitpunkten waren sowohl bei den Vorbereitern (Tab. 28), als auch in der Frühlaktation (Tab. 31) nicht so stark ausgeprägt, als dass es zu Fehlinterpretationen bei der Stoffwechselüberwachung unter Verwendung des Mittel- oder Poolwertes und einer Stichprobe von n=10 hätte kommen können.

Die individuellen Reaktionsmuster der Kühe in den beiden Versuchsabschnitten waren jedoch unterschiedlich stark ausgeprägt. In der Vorbereitergruppe scheint der BHB-Gehalt im Blut größeren individuellen Schwankungen zu unterliegen. Dies liegt womöglich an dem größeren Einfluss der Futteraufnahme und der ruminogenen Ketogenese auf den Blutgehalt der BHB (Nielsen et al. 2003).

In diesem Abschnitt wird eine ausgeprägte Lipomobilisation nicht erwartet und dementsprechend gering ist der Beitrag der hepatogenen Ketogenese zur BHB-Konzentration im Blut.

Aus diagnostischer Sicht leiten sich zusammenfassend aus der Literatur und dem Versuch folgende Grundsätze und Empfehlungen ab: (1) die NEFA und die BHB besitzen eine Tagesdynamik, wobei die höchste Konzentration bei einmaliger TMR-Vorlage für die NEFA vor und für die BHB nach der ersten Futtervorlage erreicht wird, (2) die Ausprägung der Tagesdynamik ist abhängig vom Fütterungsmanagement (TMR, Komponentenfütterung), der Rationszusammensetzung (Anteil und Zusammensetzung der Konzentrate) und dem basalen Niveau der Metaboliten, (3) unabhängig vom Laktationsstadium sollten Stoffwechseluntersuchungen in einer Herde immer zum gleichen Zeitpunkt relativ zur Fütterung durchgeführt werden. In Anlehnung an die Ausprägung der Tagesdynamik sollten die Proben so entnommen werden, dass die höchste Konzentration erfasst wird (Quiroz-Rocha et al. 2010).

### **5.3. Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode**

Die dynamischen Veränderungen der NEFA und der BHB sind in ihrer Ausprägung in der Transitperiode am größten (Vazquez-Anon et al. 1994). Insbesondere die endokrinen Veränderungen in Verbindung mit dem Geburtsstress im peripartalen Zeitraum haben großen Einfluss auf die Ausprägung der NEFA, welche aus diagnostischer Sicht nicht unbedingt in Verbindung stehen mit der Adaptation an die NEB (Herdt 1988). Die Transitperiode ist der Bereich, welcher für die Stoffwechselüberwachung unter Verwendung der NEFA und der BHB am sinnvollsten erscheint, um Aussagen über die Qualität der Adaptation an die NEB zu treffen (LeBlanc 2006). Es herrscht allerdings Uneinigkeit darüber, wie groß das Zeitfenster ist, in dem Tiere um die Geburt herum von der Stoffwechselüberwachung auszuschließen sind (Drackley 2000; LeBlanc et al. 2005). Ziel der Untersuchung war es die Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode zu beschreiben, um daraus Empfehlungen für die Diagnostik abzuleiten.

Die antepartalen NEFA-Konzentrationen waren deutlich niedriger als im postpartalen Zeitraum (Tab. 33). Bei den NEFA war ein schleichender Anstieg bis unmittelbar ante partum zu beobachten (Abb. 26). Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Autoren (Bertics et al. 1992; Vazquez-Anon et al. 1994). Die Messzeitpunkte in der letzten Woche ante partum unterschieden sich jedoch nicht signifikant voneinander. Zum Partus folgte ein exponentieller Anstieg der NEFA (+125%). Dieser Anstieg lässt sich durch drei Faktoren erklären: (1) die TM-Aufnahme sinkt zum Partus und liefert den Impuls zur Bereitstellung körpereigener Energiereserven (Vazquez-Anon et al. 1994) und (2) der Geburtsstress (Catecholamine und Glukokortikoide) liefert zusätzliche lipolytische Signale und (3) die hormonellen Veränderungen zur Kalbung (Wachstumshormon und Prolaktin) erhöhen die Sensitivität gegenüber diesen Mediatoren (Bauman und Currie 1980; Bell 1995). Insgesamt ist die Fähigkeit zur

Lipogenese im Fettgewebe stark reduziert und die Empfindlichkeit für lipolytische Signale ist erhöht (Theilgaard et al. 2002).

Im unmittelbaren Anschluss an den Partus sanken die NEFA innerhalb der ersten 24 Stunden leicht ab und verblieben auf einem Plateau bis zum Versuchsende am 10. Tag p.p. Die NEFA-Konzentrationen innerhalb der ersten 10 Tage p.p. unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Die Konzentration der BHB blieb im antepartalen Zeitraum auf einem konstant niedrigen Niveau (Abb. 27). Zum Partus sank die Konzentration der BHB weiter ab (-23%). Dies ist vergleichbar mit den Ergebnissen von Vazquez-Anon et al. (1994), wo die Konzentration der BHB vom 5. d a.p. zum 3d a.p. um 24% abnahm. Eine mögliche Erklärung bietet die geringe Futteraufnahme zur Kalbung. Der BHB-Gehalt im Blut setzt sich anteilig zusammen aus der ruminogenen und hepatogenen Ketogenese (Heitmann und Fernandez 1986). Obwohl die NEFA ausreichend Substrat für die hepatogene Ketogenese liefern würden, gibt es eine zeitliche Differenz zwischen den NEFA und der BHB bei der Reaktion auf ein akutes Energiedefizit. Bei einer Futterrestriktion um 65% in der Früh-laktation reagierten die NEFA zwei Tage vor der BHB auf das akute Energiedefizit (Nielsen et al. 2003). In der eigenen Untersuchung hebt sich die Konzentration der BHB erst ab Tag 5 p.p. von den vorherigen Zeitpunkten ab. Danach steigt die Konzentration der BHB kontinuierlich bis zum Versuchsende an. Dies ist einerseits mit der steigenden Futteraufnahme und andererseits mit dem steigenden Beitrag der hepatogenen Ketogenese zu erklären. Die Leber hat im Rahmen der Adaptation an die NEB eine zentrale Stellung bei der Koordination des Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsels (Herdt 2000a). Sowohl die Fähigkeit zur Veresterung als auch die Fähigkeit zur Oxidation der NEFA in der Leber steigert sich vom antepartalen zum postpartalen Zeitraum (Andersen et al. 2002). Dies ist in Übereinstimmung mit der Dynamik der Genexpression der GPAT (Drackley und Andersen 2008) und der Aktivität der CPT-I (Dann et al. 2000). In anderen Untersuchungen erreicht BHB die größten Konzentrationen in der zweiten bis sechsten (Hachenberg et al. 2007; Kessel et al. 2008) bzw. ersten bis zweiten Woche (Duffield et al. 1998). Die Prävalenz der subklinischen Ketose (BHB > 1,2mmol/l) war in einer kanadischen Untersuchung in den ersten beiden Laktationswochen am größten (Duffield et al. 1998).

Aus diagnostischer Sicht leiten sich daraus folgende Empfehlungen ab: (1) die Messung der NEFA kann ohne genaue Kenntnis des Kalbedatums ungefähr eine Woche a.p. durchgeführt werden, (2) das primäre Ziel ist die Identifikation von gestörten Einzeltieren, (3) Tiere, die innerhalb der folgenden drei Tage nach der Probenentnahme kalben, müssen nicht von der Diagnostik ausgeschlossen werden, (4) Tiere, die unmittelbar vorher ein Kalb geboren haben, sollten von der NEFA-Diagnostik ausgeschlossen werden, (5) die Messung der NEFA in der ersten Woche p.p. ist uneingeschränkt möglich, (5) die postpartale Verwendung der NEFA dient der Evaluierung des Managements in der Transitphase. (6) Die antepartale Verwendung der BHB macht keinen Sinn. (7) Die ausschließliche Messung der BHB in der ersten Woche p.p. ist nur bedingt geeignet, um das Ausmaß der Prävalenz

der subklinischen Ketose zu beurteilen, (8) die Verwendung der BHB in der Stoffwechselüberwachung sollte über die erste Laktationswoche hinausgehen.

## **5.4. Untersuchung der Poolproben**

Die Verwendung von gepoolten Proben stellt eine aussichtsreiche Alternative dar, um die labordiagnostischen Kosten in der Stoffwechselüberwachung zu reduzieren. Dennoch finden sie keine breite Akzeptanz (van Saun 2007a). Wesentliche Vorurteile gegenüber der Anwendung von Poolproben sind die Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse und die Nutzlosigkeit bei Erkrankungen, die durch eine Abweichung eines diagnostischen Metaboliten über oder unter einen Grenzwert („threshold-diseases“) gekennzeichnet sind (Oetzel 2004).

Ziel der Untersuchung sollte es sein, das gepoolte Verfahren mit dem bisher bewährten Verfahren der individuellen Analyse zu vergleichen. Weiterhin sollten Referenzkriterien festgelegt werden und Interpretationsempfehlungen erarbeitet werden.

### **5.4.1. Stichprobenplanung**

Die mittlere Anzahl Stichproben je Betrieb lag in dieser Untersuchung bei 8,26 Proben. Die Forderung nach 10 Stichproben je Betrieb konnte bei 110 Betrieben (39,6%) erfüllt werden (Tab. 36).

Die mittlere Anzahl Proben je Betrieb in dieser Untersuchung war abhängig von der Anzahl an Tieren auf dem Betrieb, die sich zu dem Zeitpunkt in der ersten Laktationswoche befanden und klinisch gesund waren. In kleineren Herden kann die Anforderung einer angemessenen Stichprobenzahl von mehr als 8 je Betrieb und Risikogruppe nicht immer erfüllt werden, vor allem in den kleinen Gruppen (z.B. Trockensteher, Fresh cows) (Cook et al. 2006). Bei zweifelhaften Ergebnissen kann dies durch eine wiederholte Probenentnahme zu einem späteren Zeitpunkt umgangen werden. Die individuelle Kuh sollte dabei nur einmal und nicht wiederholt beprobt werden (Oetzel 2004). Die wiederholte Stichprobenentnahme, um zu einer ausreichenden Stichprobenzahl zu gelangen, kam auf Grund des hohen Aufwandes (Entfernung der Betriebe, hohe Variation der Kuhzahl je Betrieb) hier nicht in Frage.

Eine Unterschreitung der angemessenen Stichprobengröße ( $n < 10$ ) beinhaltet das Risiko, dass der Mittel- bzw. Poolwert stärker durch Ausreißer verzerrt wird (Probe 10 in Tab. 53). Je kleiner die Stichprobengröße ist (Nennerterm), desto größer ist der Einfluss eines Ausreißers (Zählerterm) auf den arithmetischen Mittelwert oder den Poolwert (Zählerterm/ Nennerterm) einer Stichprobe.

Tabelle 53: Einfluss eines Ausreißers auf den Mittelwert der Stichprobe bei abnehmender Stichprobengröße

Stichprobengröße	Probe										Mittelwert der Stichprobe	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
10	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	2,0	0,65
9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		2,0	0,67
8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5			2,0	0,69
7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5				2,0	0,71
6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5						2,0	0,75
5	0,5	0,5	0,5	0,5							2,0	0,80
4	0,5	0,5	0,5								2,0	0,88
3	0,5	0,5									2,0	1,00
2	0,5										2,0	1,25
1											2,0	2,00

Die Ausreißer können einerseits Ausdruck der biologischen Variation sein. Andererseits gibt es Tiere, die erhebliche tageszeitliche Schwankungen für die NEFA und zum Teil auch für die BHB aufweisen. Weitere Ursachen für die Integration von Ausreißern in die Stichprobe sind zufällige Stresseinflüsse, welche zu einer Erhöhung der NEFA führen (Brickner et al. 2007), und nicht erkannte, klinisch kranke Tiere bzw. Tiere, die eine gestörte Futteraufnahme aufweisen.

#### 5.4.2. Einzelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum

Die 2298 Einzelwerte in dieser Untersuchung zeigen eine große Spannweite für die NEFA von 0,02 bis 3,06mmol/l und für die BHB von 0,06 bis 6,4mmol/l (Tab. 37). Beide Parameter weisen eine unterschiedlich starke positive Schiefe auf. Die positive Schiefe der Verteilungsfunktion ist nicht untypisch für labordiagnostische Parameter in der Veterinärmedizin (Willer 1982).

Trotz der Prämisse, nur klinisch gesunde Tiere in die Stoffwechseluntersuchung zu integrieren, befinden sich bei der BHB 74 (3,22%) Tiere über dem Grenzwert für die klinische Ketose von 3,0mmol/l. Oetzel (2004) erklärt dies zum einen dadurch, dass ein Teil der Tiere trotz hoher BHB-Werte keine klinischen Symptome zeigt und zum anderen führt er es auf eine schlechte Tierbeobachtung innerhalb der Herden zurück. Andererseits beinhaltet die Herleitung von Referenzgrenzen unter Verwendung von Streuungsmaßen ( $\bar{x} \pm 1,96 \times s$ ) die Gefahr, dass 5% der gesunden Tiere abnorme Werte aufweisen, obwohl sie gesund sind.

Die Verteilung der Einzelbeobachtungen der NEFA deckt sich mit den Beobachtungen aus der Literatur. In einer Untersuchung von LeBlanc et al. (2005) an 1063 Tieren in der ersten Woche p.p. befanden sich 58,1% (eigene Untersuchung 55,66%) der Tiere oberhalb von 0,6mmol/l, 37,5% (eigene

Untersuchung 40,08%) oberhalb von 0,8mmol/l und 23,1% (eigene Untersuchung 27,31%) oberhalb von 1,0mmol/l.

Bei Betrachtung der BHB sind die eigenen Ergebnisse in weitgehender Übereinstimmung mit einer kürzlich erschienen Studie mit 972 Tieren in der ersten Woche p.p. (Duffield et al. 2009). Dabei waren 36,5% (eigene Untersuchung 32,85%) der Tiere oberhalb von 1,0mmol/l, 24,6% (eigene Untersuchung 20,97%) oberhalb von 1,2mmol/l und 16,6% (eigene Untersuchung 15,19%) oberhalb von 1,4mmol/l. Die Verteilung der Einzelwerte verdeutlicht, dass ein gewisser Teil der untersuchten Einzeltiere subklinische Stoffwechselstörungen aufwies.

### **5.4.3. Pool- und Mittelwerte der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum**

Die deskriptive Statistik der Mittel- und Poolwerte zeigt nur geringe Abweichungen gegenüber den Einzelmessungen (Tab. 37 und 39). Die Standardabweichung und somit auch der Variationskoeffizient der Mittel- und Poolwerte sind reduziert gegenüber den Einzelwerten. Dies gebietet die mathematische (Mittelwerte) und methodische (Poolwerte) Grundlage dieser Methoden und ist in Übereinstimmung mit der Literatur (Lehwenich 1999).

Rossow et al. (1987) geben als Referenzbereich für Poolproben bei Milchkühen für die NEFA 0,1 bis 0,5mmol/l und für die BHB bis 1,0mmol/l an.

In der eigenen Untersuchung liegen 227 Herden (81,65%) über dem angegebenen Referenzbereich der NEFA. Trotz der großen aktuellen Bedeutung der NEFA in der Diagnostik beim Einzeltier mit zahlreichen Referenzvorschlägen fehlt es an aktuellen Referenzwerten für Poolproben und für Stichproben, in denen der Mittelwert beurteilt wird. Die beachtliche Zahl an Herden über dem Referenzwert von Rossow et al. (1987) unterstreicht die Bedeutung von zeitgemäßen Referenzwerten. Allein die Laktationsleistung der Herdbuchkühe in Brandenburg hat sich von 1991 bis 2008 von 4914kg auf 9004kg nahezu verdoppelt (Adler 2009). Die damit einhergehende gestiegene Anforderung an die Adaptationsfähigkeit der modernen Milchkuh findet sich auch in den entsprechenden diagnostischen Metaboliten wieder (Kessel et al. 2008).

Bei der BHB liegen 117 Herden (42,08%) über dem vorgeschlagenen Referenzbereich von Rossow et al. (1987). Lehwenich (1999) konnte in einer Untersuchung an 98 Herden vergleichbare Ergebnisse bezüglich der BHB-Poolwerte in der ersten Woche p.p. ermitteln. Der Mittelwert der Poolproben betrug hier 1,09mmol/l (eigene Untersuchung 1,01mmol/l) bei einer Standardabweichung von 0,38mmol/l (eigene Untersuchung 0,36mmol/l). Ähnlich wie bei den NEFA fehlt es auch bei der BHB an aktuellen Vorschlägen für Referenzbereiche für Poolproben und Stichprobenmittelwerte in der Stoffwechselüberwachung von Milchviehherden.

#### **5.4.4. Verteilung der untersuchten Parameter**

Die Verteilung der Einzelwerte der NEFA und der BHB weicht stark von einer Normalverteilung ab (Abb. 28 und 29). Zur Angleichung an eine Normalverteilung wird eine logarithmische Transformation empfohlen (Herdt et al. 1998). Die logarithmische Transformation der Einzelwerte führt in dieser Untersuchung zu einer grafischen Annäherung an die Normalverteilung (Abb. 30 und 31). Dies kann allerdings nicht signifikant mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test gesichert werden.

Getreu dem zentralen Grenzwertsatz tendieren die Mittel- und Poolwerte zur Normalverteilung (Abb. 32 und 33). Dies konnte aber statistisch nicht gesichert werden. Eine Erklärung bietet das Einbeziehen der Poolproben mit den geringen Stichprobengrößen (Lorenz 1992). Bei ausschließlicher Verwendung der Herden (n=110) mit 10 Stichproben konnte die Normalverteilung der Poolwerte statistisch signifikant ( $p > 0,05$ ) belegt werden.

#### **5.4.5. Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwerten**

Der statistische Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwerten der NEFA und der BHB stellt einen Kompromiss dar. Eigentlich müssten beide Messmethoden mit dem wahren Mittelwert der Stichprobe gegenüber gestellt werden. Dieser ist aber unbekannt. Sowohl die individuellen Messungen der Einzelproben zur Berechnung des arithmetischen Mittelwertes als auch die Messung einer gepoolten Probe sind mit Messfehlern verbunden. Das bedeutet, dass beide Verfahren in einem unbekanntem Maß vom wahren Mittelwert abweichen.

Zur Etablierung gepoolter Proben in der Stoffwechselüberwachung von Milchviehherden ist allerdings der Vergleich mit der bewährten Methode der individuellen Messung unumgänglich. Die hier gewählten statistischen Methoden sind die lineare Regressionsanalyse und der Bland-Altman-Methodenvergleich.

##### **5.4.5.1. Lineare Regression**

Der Methodenvergleich unter Anwendung der linearen Regressionsanalyse zeigt einen übereinstimmenden Informationsgehalt der Mittel- und Poolwerte der NEFA und der BHB (Abb. 34). Die 95%-Konfidenzintervalle des Anstiegs und der Konstanten der Regressionsgeraden umschließen die ideale Gerade  $y = x$ . Dies konnte in einer anderen Arbeit unter Anwendung desselben statistischen Verfahrens für eine Vielzahl von Serumparametern bestätigt werden (Lehwenich 1999). Die Anwendung der linearen Regressionsanalyse birgt allerdings die Gefahr, dass man zu falschen Interpretationen gelangen kann. Die Tatsache, dass beide Messverfahren mit Zufallsfehlern behaftet sein können, führt dazu, dass es selbst bei Übereinstimmung der Messmethoden zum Ausschluss der idealen Gerade kommen kann (Bland und Altman 2003).

### 5.4.5.2. Bland-Altman Methodenvergleich

Der Bland-Altman-Methodenvergleich zeigt, dass es hinsichtlich der mittleren Differenz keinen Unterschied zwischen den Mittel- und Poolwerten der NEFA und der BHB gibt. Dies ist allerdings nicht gleichbedeutend mit der Übereinstimmungsgüte der beiden Messmethoden, da diese Entscheidung keine statistische, sondern vielmehr eine klinische ist (Bland und Altman 2003). Von entscheidender Bedeutung ist, ob die Übereinstimmungsgrenzen ( $D \pm 1,96 \times s$ ) eine klinische Relevanz besitzen oder nicht.

In der Literatur existieren bisher keine Angaben zu den Übereinstimmungsgrenzen gepoolter Proben der NEFA und der BHB beim Rind. Bei mittlerer Spannweite des Wertebereichs wird die Verwendung der relativen Differenz mit den entsprechenden relativen Übereinstimmungsgrenzen empfohlen, um den Einfluss des Wertebereichs auf die absoluten Übereinstimmungsgrenzen zu reduzieren (Dewitte et al. 2002). Im oberen Wertebereich würde man höhere Differenzen erwarten als im unteren. Die absoluten Übereinstimmungsgrenzen sind in dieser Untersuchung über die Spannweite des Wertebereichs ausreichend konstant, um dies zu vernachlässigen (Abb. 35 und 37). Dies wird deutlich bei der Betrachtung der relativen Übereinstimmungsgrenzen (Abb. 36 und 38). Hier kommt es zu einer deutlich geringeren Streuung in der oberen Hälfte des Wertebereichs durch den Einfluss des Nenners (Durchschnitt von Mittelwert und Poolwert).

Die klinische Relevanz, die zur Ablehnung einer Messmethode führen würde, ist gegeben, wenn es unter Anwendung einer neuen Messmethode (Poolproben) zu Fehleinschätzungen gegenüber der bewährten Methode (arithmetischer Mittelwert) kommt, die aus klinischer Sicht nicht zu akzeptieren sind. Am Beispiel der NEFA und der BHB würde dies bedeuten, dass unter Anwendung des Poolwertes der Praktiker zu dem Ergebnis kommt, dass diese Herde bezüglich der Adaptation des Energiestoffwechsels im Transitbereich keine Störungen aufweist, obwohl der arithmetische Mittelwert der Einzelproben dies anzeigen würde bzw. der Poolwert eine gestörte Herde vorgibt, obwohl diese frei von Störungen ist.

Es bleibt festzuhalten, dass die Abweichungen zwischen dem Poolwert und dem arithmetischen Mittelwert der Einzelproben aus klinischer Sicht befriedigend sind, um zu einer richtigen Beurteilung der Herden zu kommen.

Der Einfluss der beiden Ausreißer bei der relativen Differenz der NEFA ist beachtlich, allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei Betrachtung der relativen Differenz der Einfluss einer hohen absoluten Differenz im unteren Wertebereich ungleich höher ist als im oberen. Eine mögliche Erklärung bietet der methodische Fehler (Fehler bei der Herstellung der Poolprobe), doch beim Vergleich mit der relativen Differenz der BHB lässt sich kein Zusammenhang feststellen.



#### **5.4.6. Zusammenhang zwischen dem Poolwert und der Anzahl an Tieren über dem Referenzwert**

Die Abweichung des Poolwertes vom erwarteten Mittelwert ist bedingt durch Tiere mit ausgeprägten diagnostischen Metaboliten. Die Höhe der Abweichung des Poolwertes ist abhängig von der Anzahl an Tieren und dem Umfang der Störung des Einzeltieres. Eine moderate Abweichung des Poolwertes resultiert entweder aus mehreren Tieren mit moderaten Abweichungen oder aus wenigen Tieren mit sehr niedrigen oder hohen Werten (Ausreißer). Das Letztere ist nicht erwünscht und erschwert die Interpretation.

Die Ergebnisse (Tab. 42 und 43) zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl an Tieren über einem Referenzwert und dem entsprechenden Poolwert gibt. Mit steigender Anzahl an Tieren, die eine Abweichung in der Konzentration der NEFA oder der BHB aufzeigen, verändert sich der Poolwert entsprechend. In einer anderen Arbeit konnte dies bestätigt werden (van Saun 2007a). Hier wurde konstatiert, dass sich unter 10% der Tiere mit abnormen Werten in der gepoolten Probe befanden, wenn der Poolwert sich um ungefähr 0,25mal (Reichweite von 0,1 bis 0,5 für die unterschiedlichen Metaboliten) die Standardabweichung der gesunden Population vom gesunden Populationsmittelwert entfernt befand. Anders formuliert bedeutet das für die NEFA und die BHB, dass die Anzahl an Tieren mit abnormen Werten innerhalb des Pools sich um 10% steigert, wenn der Poolwert sich um den x-fachen Betrag der Standardabweichung (NEFA  $x = 0,257$  und BHB  $x = 0,311$ ) vom gesunden Populationsmittelwert entfernt (van Saun 2007a). Der Bereich Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung der gesunden Population wurde für die NEFA mit 0,058 bis 0,662mmol/l und für die BHB mit 0,16 bis 1,3mmol/l angegeben. In der eigenen Untersuchung entspricht dies dem Anstieg des Regressionsmodells (Tab. 42 und 43). Bei einer Stichprobengröße von  $n=10$  steigert sich der Poolwert um den Betrag des Anstiegs der Regressionsgeraden, wenn sich die Anzahl an Tieren mit abnormen Werten in der Stichprobe um ein Tier erhöht.

Die Unterschiede im Bestimmtheitsmaß des Regressionsmodells zwischen der NEFA und der BHB in der eigenen Untersuchung werden durch den unterschiedlichen Gehalt an Ausreißern in der Population der beiden Metaboliten erklärt. Diese Ausreißer bei der BHB sind Tiere, die erhöhte BHB-Konzentrationen aufweisen, ohne klinische Symptome zu zeigen. Diese Ausreißer beeinflussen die Beziehung zwischen dem Poolwert und der Anzahl an Tieren über dem Referenzwert negativ. In der eigenen Untersuchung waren % über dem Grenzwert für die klinische Ketose (3mmol BHB/l). In einer vergleichbaren Untersuchung von Oetzel (2007) an 74 Herden und 1074 Einzeltieren zeigten ungefähr 4% der Tiere BHB-Konzentrationen  $> 3,0$  mmol/l. Dies sind einerseits Tiere, die hohe BHB-Konzentrationen tolerieren, ohne klinische Symptome zu äußern (Duffield und LeBlanc 2009). Andererseits repräsentieren diese Tiere verpasste Ketosefälle und stellen die Einzeltierüberwachung innerhalb der Herden in Frage (Oetzel 2007).

Die Abhängigkeit der Konstante (a) von dem Referenzwert für das Einzeltier ist dadurch zu erklären, dass die Anzahl der Herden mit null Tieren über dem Referenzwert und demzufolge auch der mittlere Poolwert dieser Herden zunimmt, wenn man den Referenzwert für das Einzeltier erhöht. Die 95%-Konfidenzintervalle der Konstante (a) bieten die Möglichkeit den wahren Mittelwert der Herden mit null Tieren über dem Einzeltierreferenzwert zu schätzen. Mit einer 95%igen Wahrscheinlichkeit liegt der wahre Mittelwert dieser Herden im Bereich zwischen oberem und unterem 95%-Konfidenzintervall. Somit kann dieses Verfahren genutzt werden, um einen Referenzbereich für die NEFA und die BHB zu berechnen.

#### **5.4.7. Zusammenhang zwischen dem Poolwert der Stichprobe und dem kleinsten und größten Einzelwert in der Stichprobe**

Die Anwendung von Stichprobentestverfahren zur Stoffwechselüberwachung auf Herdenebene setzt voraus, dass sich eine subklinische Stoffwechselstörung gleichgerichtet auf die Auslenkung der diagnostischen Metaboliten in einer Tiergruppe auswirkt (van Saun 2007a). Eine wesentliche Kritik gegenüber Stichprobenmittelwerten und Poolproben ist, dass der Stichprobenmittelwert bzw. der Poolwert bei einer Kombination von Abweichungen in der Stichprobe nach unten und nach oben zu keiner Aussage fähig ist. Obwohl es für die NEFA und die BHB keine pathologisch relevanten Abweichungen nach unten gibt (Oetzel 2007), könnte man dennoch vermuten, dass der Stichprobenmittel- bzw. der Poolwert einer Gruppe keine Störung signalisiert, wenn sich ungestörte (mit niedrigen NEFA- oder BHB-Werten) und gestörte (mit erhöhten NEFA- oder BHB-Werten) Tiere in einer Stichprobe befinden. Diese Kritik kann durch die Ergebnisse aus der multiplen Regressionsanalyse zurückgewiesen werden (Tab. 44 und 45). Hiernach besteht ein positiver Zusammenhang zwischen dem kleinsten und größten Wert der NEFA bzw. BHB aus der Stichprobe und dem entsprechenden Poolwert. Geht man davon aus, dass die Auslenkungen der diagnostischen Metaboliten in der zufällig gewonnenen Stichprobe die Verhältnisse in der Tiergruppe repräsentieren, zeigt dies, dass der Poolwert der Stichprobe diese Auslenkung wiedergibt. Andererseits wäre zu erwarten, dass nur der kleinste oder größte Wert in der Stichprobe einen Einfluss auf den Mittel- bzw. Poolwert besitzt.

Der Einfluss des größten Wertes in der Stichprobe auf die Auslenkung des Poolwertes ist größer gegenüber dem Einfluss des kleinsten Wertes. Bei Betrachtung des Quadrats der semipartialen Korrelation ( $sr^2$ ) aus dem multiplen Regressionsmodell scheint dies bei der BHB ausgeprägter zu sein als bei den NEFA. Dies unterstützt die Ergebnisse aus der linearen Regressionsanalyse.

#### **5.4.8. Ermittlung von Referenzwerten für die Verwendung von Poolproben**

Referenzwerte beziehen sich in der Regel auf gesunde Referenzindividuen, die einer definierten und mit Präzision beschriebenen Referenzpopulation angehören. Hierbei ist insbesondere die Definition der Gesundheit von kritischer Bedeutung (Geffre et al. 2009). Nach der WHO wird Gesundheit als „komplettes physisches, psychisches und mentales Wohlbefinden“ beschrieben. Diese Definition ist auf einzelne Tiere nur schwer übertragbar und bezogen auf Herden eigentlich unmöglich. Es bedarf daher einer präzisen und quantifizierbaren Definition mit Ein- und Ausschlusskriterien bezüglich der Gesundheit von Einzeltieren und Herden. Auf Grund der Komplexität der Gesundheit auf Herdenebene erscheint die Einrichtung einer ausreichend großen Referenzpopulation, welche aus gesunden Herden besteht, nur schwer vorstellbar.

Vielmehr sollten die Tiere und Herden einer Referenzpopulation folgenden Kriterien entsprechen (Rossow et al. 1987):

- Fehlen klinisch manifester Stoffwechselstörungen und sonstiger Erkrankungen
- annähernde Übereinstimmung zwischen Nährstoffangebot und tatsächlich realisierter Leistung
- normale Fruchtbarkeitssituation
- gleiche Altersgruppe
- gleicher Laktationsstatus

Bei der Festlegung von Referenzwerten müssen insbesondere Faktoren berücksichtigt werden, die einen Einfluss auf die Streuung der Ergebnisse haben könnten. Die Variation eines biologischen Merkmals wird bestimmt durch analytische und biologische Variationsfaktoren. Die analytischen (prä- und postanalytisch) Variationsursachen lassen sich durch Qualitätskontrolle und Standardisierung minimieren. Die biologischen Variationsfaktoren (z.B. Alter, Rasse, Geschlecht, Laktationsstadium) müssen durch unterschiedliche Referenzwertfestlegungen berücksichtigt werden.

Die benötigte Größe der Referenzpopulation ist vor allem abhängig vom Verteilungstyp der Variable (Geffre et al. 2009). Bei deutlicher Abweichung von einer Normalverteilung mit ausgeprägter Schiefe der Verteilungsfunktion wird unter Anwendung nicht-parametrischer Verfahren eine große Population nötig. Die minimale Anzahl an nötigen Beobachtungen für nicht parametrische Verfahren liegt ungefähr bei 120 (Solberg und Grasbeck 1989).

Die Ermittlung von Referenzwerten oder -intervallen beruht in der Regel darauf, nur einen Teil der in einer Referenzpopulation gemessenen Werte zu verwenden. Bei zweiseitiger Fragestellung sind dies meist die zentralen 95%. Demzufolge haben 5% der gesunden Referenzindividuen Werte, die ober- oder unterhalb der Referenzgrenzen liegen. Bei der Ermittlung von Referenzwerten werden verschiedene Methoden unterschieden, die abhängig vom Verteilungstyp des Parameters in der Referenzpopulation sind. Hierzu zählen die parametrischen und die nicht-parametrischen Methoden.

Eine neuere Methode zur Festlegung von Referenzwerten nutzt keine Referenzpopulation, sondern Datenmaterial von gesunden und kranken Individuen (Geffre et al. 2009). Hierzu ist eine Vielzahl von

Daten nötig. Dabei werden unter Anwendung mathematischer Methoden die gesunden von den kranken Individuen getrennt und die extrahierten Daten werden benutzt, um Referenzwerte zu bestimmen. Dieses Verfahren ist weniger zuverlässig, wenn die Verteilungsfunktion eine große Schiefe und/oder Exzess aufweist (Ferre-Masferrer et al. 1999). In der Veterinärmedizin wurde dies bisher beim Hund (Concordet et al. 2009) und beim Schaf (Dimauro et al. 2008) angewendet.

Grundsätzlich bestehen Unterschiede bei der Festlegung von Referenzwerten für das einzelne Tier und dem Mittelwert einer Gruppe.

Der Vergleich eines Gruppenmittelwertes mit einer Referenzpopulation aus Einzeltieren erfolgt durch Festlegung von Kontrollgrenzen. Diese werden nach folgender Formel berechnet:  $\mu \pm u_{1-\alpha/2} \times s/\sqrt{n}$ . Für die Stichprobengröße von  $n = 10$  und einem Risiko erster Art von  $\alpha = 0,10$  errechnen sich die obere und untere Kontrollgrenze nach  $\mu \pm 0,5 \times s$  (Willer 1982). Dieses Verfahren konnte in der vorliegenden Untersuchung allerdings nicht angewendet werden, da die Einzeltiere nicht den Anforderungen der Referenzpopulation entsprechen.

Die nach Rossow et al. (1987) erforderlichen Kriterien an die Tierpopulation zur Berechnung von Referenzwerten wurden nur teilweise erfüllt. Die Tiere waren frei von klinischen Erkrankungen, entstammten einer umschriebenen Altersgruppe und dem gleichen Laktationsstadium. Dennoch konnte das Vorhandensein von subklinischen Erkrankungen bzw. einem Missverhältnis zwischen Nährstoffangebot und Leistung in den untersuchten Herden nicht ausgeschlossen werden, da die Aufforderung zur Stoffwechseluntersuchung dies häufig voraussetzte.

In der eigenen Untersuchung wurden zwei Verfahren angewendet, um eine Referenzpopulation zu definieren. Zum einen wurde ein von Oetzel (2004) vorgeschlagenes Verfahren zur Stoffwechseluntersuchung modifiziert. Zum anderen wurde ein grafisches Verfahren benutzt, um an Hand der Verteilungsfunktion eine Referenzpopulation zu separieren.

Die Berechnung der Referenzgrenzen erfolgte durch parametrische und nicht-parametrische Streuungsmaße und durch die ROC-Kurvenanalyse.

#### **5.4.8.1. Definition einer Referenzpopulation an Hand des Anteils an gestörten Tieren in der Stichprobe**

Die Definition der Herden beruhte hier auf der Anzahl an Tieren in der Stichprobe, welche durch Einzeltierreferenzwerte als gestört identifiziert wurden. Zur Einrichtung einer Referenzpopulation nach diesem Verfahren muss daher eine individuelle Analyse aller Werte durchgeführt werden. Weiterhin müssen zuverlässige Einzeltierreferenzwerte bekannt sein und es muss definiert werden, wie groß der Anteil an gestörten Tieren in der Stichprobe sein darf.

Die Einzeltierreferenzwerte wurden der Literatur entnommen (Geishauser et al. 1997; Van Saun 2004; LeBlanc et al. 2005; Walsh et al. 2007; Carson et al. 2008; Duffield et al. 2009; Ospina et al. 2010b). Diese Werte sind keine klassischen Referenzwerte, welche aus einer gesunden Population unter

Anwendung von Streuungsmaßen ermittelt wurden. Es sind vielmehr Grenzwerte, die genutzt werden, um die Wahrscheinlichkeit eines bestimmten Ereignisses (z.B. Labmagenverlagerung) vorherzusagen. Sie wurden in den Untersuchungen mit dem Risiko für verschiedene Erkrankungen (LMV, Metritis, Ketose, Fruchtbarkeitsstörung) der Einzeltiere assoziiert und beziehen sich auf den Zeitraum der ersten Woche p.p. (Tab. 11). In einer neueren Untersuchung mit 527 Kühen, welche in der ersten Woche keine Gesundheitsstörung aufwiesen, wurden Referenzbereiche unter Anwendung von Streuungsmaßen ( $\bar{x} \pm 1,96 \times s$ ) ermittelt (Quiroz-Rocha et al. 2009). Diese betragen für die NEFA 0,1 bis 1,4mmol/l und für die BHB 0,22 bis 1,17mmol/l.

Die kritische Anzahl von null Tieren für gesunde Herden, ein bis zwei Tiere für verdächtige Herden und mehr als zwei Tieren für gestörte Herden mit erhöhten NEFA- oder BHB-Werten in der Stichprobe stimmt mit Oetzel (2004) überein. Legt man allerdings die unterschiedlichen Stichprobenzahlen zu Grunde bedeutet dies eine Differenz bei dem proportionalen Anteil in der Stichprobe. Dieser beträgt bei einer Stichprobengröße von  $n = 10$  bei drei Tieren 33% (bzw. mehr als 2 Tiere von 10 entspricht > 20%) und bei  $n = 12$  25% (bzw. mehr als 2 Tiere von 12 entspricht 17%). Dies ist in Übereinstimmung mit der Verwendung von Toleranzgrenzen nach Fülll (2005). Bei einer Stichprobengröße von  $n = 10$  liegt eine Gesundheitsgefährdung vor, wenn sich mehr als 20% der Einzeltiere außerhalb der Toleranzgrenzen (obere Toleranzgrenze 0,62mmol/l für die NEFA und die BHB) befinden (Fülll 2005).

In einer Untersuchung zur Ketose auf Herdenebene von Oetzel (2007) an 53 Herden mit einer minimalen Stichprobengröße von  $n = 12$  im Zeitraum von 5 bis 50d p.p. waren 14 Herden (26%) negativ (null Kühe mit BHB >1,4mmol/l), 18 Herden (34%) verdächtig (1 bis 2 Kühe mit BHB >1,4mmol/l) und 21 Herden (40%) positiv (mehr als 2 Kühe mit BHB >1,4mmol/l). Nach dieser Einteilung waren in der eigenen Untersuchung bei einer Stichprobengröße von  $n = 10$  in der ersten Laktationswoche von 110 Herden 40 Herden (36,36%) mit null Tieren, 48 Herden (43,64%) mit 1 bis 2 Tieren und 22 Herden (20%) mit mehr als 2 Tieren, die eine BHB-Konzentration größer als 1,4mmol/l aufwiesen. Diese Unterschiede lassen sich mit der unterschiedlichen Stichprobengröße, dem größeren Untersuchungszeitraum und einem womöglich anderen Leistungsniveau der Herden erklären. Weiterhin verwenden beide Untersuchungen eine Gelegenheitsstichprobe und sind somit nicht repräsentativ.

Hiernach setzt sich die Referenzpopulation aus den ungestörten Herden zusammen. Als vorteilhaft kann angesehen werden, dass dies eine quantifizierbare Definition von Gesundheit darstellt und die Verteilungsfunktion der verdächtigen und gestörten Herden gleichzeitig bekannt ist. Schwachstelle dieses Verfahrens ist die Qualität der Einzeltierreferenzwerte und die Tatsache, dass bei zukünftiger Anwendung für weitere Laborparameter eine individuelle Analyse aller Proben nötig ist.

### **5.4.8.2. Definition einer Referenzpopulation an Hand der Schiefe der Verteilungsfunktion der Poolproben**

Die Definition und Nutzung einer Referenzpopulation zur Bestimmung von Referenzwerten ist zeit- und kostenaufwendig. Die Abgrenzung von gesund und krank stellt den limitierenden Faktor für die Qualität der Referenzwerte dar. Eine neuere Methode zur Festlegung von Referenzwerten nutzt keine Referenzpopulation, sondern Datenmaterial von gesunden und kranken Individuen (Geffre et al. 2009). Hierzu ist eine Vielzahl von Daten nötig. Dabei werden unter Anwendung mathematischer Methoden die gesunden von den kranken Individuen getrennt und die extrahierten Daten werden benutzt, um Referenzwerte zu bestimmen.

Diese mathematischen Methoden sind von komplexer Natur und nutzen unterschiedliche Algorithmen zur Lösung des Problems. Es sind im wesentlichen drei Methoden bzw. Modifikationen dieser drei Methoden (Martin et al. 1981; Naus et al. 1982; Kairisto et al. 1994; Concordet et al. 2009). Bei der Methode nach Kairisto et al. (1994) werden vermutlich kranke Individuen ausgeschlossen und die verbliebene Population wird dann in zwei halbe Normalverteilungen geteilt. Die Methode nach Martin et al. (1981) nutzt eine Gram-Charlier Reihe zur Beschreibung der Verteilungsfunktion. Hierfür müssen Schätzwerte für den Mittelwert und die Standardabweichung der gesunden Population vorhanden sein. Die dritte Methode ist die Bhattacharya-Prozedur. Diese nutzt eine Gamma-Funktion und setzt voraus, dass sich die Populationen nicht überlappen dürfen, normalverteilt sein müssen und die Stichprobenzahl groß sein muss. Diese Methode unterlag einiger Modifikationen, sodass die ursprünglichen Voraussetzungen nur noch zum Teil gelten müssen (Naus et al. 1982; Concordet et al. 2009). Im allgemeinen sind diese Verfahren weniger zuverlässig, wenn die Verteilungsfunktion eine große Schiefe und/oder Kurtosis aufweist (Ferre-Masferrer et al. 1999). Die Stichprobenzahl muss umso größer sein, je mehr die Verteilungen der gesunden und der kranken sich überlappen (Concordet et al. 2009). Wesentlicher Vorteil dieses Verfahrens ist, dass man ohne Kenntnis des wahren Gesundheitsstatus bzw. ohne Definition einer Referenzpopulation Grenzwerte ermitteln kann. Allerdings sind die so ermittelten Referenzwerte mit Vorsicht anzuwenden (Geffre et al. 2009).

Die Anwendung dieses Verfahrens zur Ermittlung von Grenzwerten für Poolproben ist noch nicht beschrieben. Die Poolproben sollten sich insofern für dieses Verfahren eignen, als dass sie getreu dem zentralen Grenzwertsatz eine Normalverteilung aufweisen sollten. Daher wurde auf den Gebrauch der komplexen mathematischen Algorithmen verzichtet und die Separierung der vermutlich kranken Herden wurde grafisch gelöst (Abb. 40 und 41). Die Verteilungsfunktion aller Herden setzt sich aus den gesunden und kranken Herden zusammen, wobei die einzelnen Verteilungsfunktionen der gesunden und kranken unbekannt sind. Für die NEFA und die BHB befinden sich die kranken Herden im oberen Wertebereich. Eine Abweichung von der Schiefe der Normalverteilung mit einer positiven Schiefe dürfte auf dem Einschluss kranker Herden beruhen. Eine positive Schiefe (linkssteilrechtsschief) kommt zustande, wenn der Mittelwert größer ist als der Median und die Verteilung einen

„langen Schwanz“ im oberen Wertebereich aufweist. Daher sollte die Annäherung der Schiefe zur Normalverteilung zum Ausschluss der vermutlich kranken Herden führen.

Dieses Verfahren führte bei den 110 Herden zum Ausschluss von 15 Herden (13,64%) für die NEFA und 22 Herden (20%) für die BHB. Durch Anwendung von Streuungsmaßen können aus der abgetrennten Herdenpopulation Referenzgrenzen für gepoolte Proben berechnet werden, ohne dass der wahre Status der Stoffwechselfgesundheit der Herden bekannt ist und ohne die aufwendige Analyse aller Einzelproben.

### **5.4.8.3. Anwendung von parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen zur Berechnung von Referenzwerten**

Bei Normalverteilung der Parameter bedient man sich der Formel Mittelwert plus/minus k-facher Standardabweichung ( $\bar{x} \pm k \times s$ ). Der Faktor k ist abhängig vom Risiko erster und zweiter Art. Bei Verwendung der zweifachen Standardabweichung liegen annähernd 95% der Beobachtungen in dem Bereich  $\bar{x} \pm 2 \times s$ . Dies entspricht einem Fehler erster Art von  $\alpha = 0,05$ . Rossow et al. (1987) empfehlen für die Stoffwechselüberwachung von Milchviehherden die Verwendung der einfachen Standardabweichung ( $k = 1$ ). Dies entspricht einem Fehler erster Art von  $\alpha = 0,33$ . Das bedeutet, dass 33% aller untersuchten Gruppen als falsch positiv beurteilt bzw. als nicht gesund bezeichnet werden könnten, obwohl sie es sind. Je höher der Wert für das  $\alpha$ , desto sorgfältiger müssen die Ergebnisse interpretiert werden. In der Stoffwechselüberwachung ist aber das Risiko zweiter Art, das die Wahrscheinlichkeit für nicht erkannte Abweichungen angibt, schwerwiegender, so dass  $\beta$  möglichst klein gehalten werden muss.  $\alpha$  und  $\beta$  verhalten sich reziprok zueinander.

Bei Nicht-Normalverteilung eines Parameters können Perzentile verwendet werden. Unter Berücksichtigung des Fehlers erster Art von  $\alpha = 0,05$  und  $\alpha = 0,33$  kommen die 2,5%- und 97,5%-Perzentile und die 16%- und 84%-Perzentile zum Einsatz.

Die Verwendung der parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaße zur Berechnung von Referenzwerten in der eigenen Untersuchung ist unter Einbeziehung aller Herden nicht sinnvoll, weil diese Herdenpopulation auch stoffwechselgestörte Herden einbeziehen würde.

Vielmehr würde sich die Verwendung der stoffwechselgesunden Herden anbieten. Zum Ausschluss der stoffwechselgestörten Herden wurden die beiden Verfahren zur Definition einer Referenzpopulation genutzt.

Bei Anwendung der zwei unterschiedlichen parametrischen und nicht parametrischen Referenzgrenzen in der Stoffwechselüberwachung müssen die Konsequenzen aus den unterschiedlichen Fehlern erster und zweiter Art berücksichtigt werden. Während bei  $\alpha = 0,33$  mit einer vermehrten Zahl falsch positiver Herden gerechnet werden muss, ist die Gefahr einer übersehenen Abweichung weitaus geringer (kleiner Fehler zweiter Art). Das Gegenteil gilt für  $\alpha = 0,05$ .

In Abhängigkeit von der Definition der Referenzpopulation kann eine Herde mit großer Sicherheit als Richtig-Negativ beurteilt werden, wenn der Poolwert den kleinsten Referenzwert ( $\bar{x} + 1s$  bzw. 84%-Perzentil) unterschreitet. Demgegenüber kann bei Überschreiten des oberen Referenzwertes ( $\bar{x} + 1,96s$  bzw. 97,5%-Perzentil) mit großer Sicherheit von einer Richtig-Positiven Herde ausgegangen werden.

#### **5.4.8.4. ROC-Kurvenanalyse**

Die grundlegende Annahme für die ROC-Kurvenanalyse ist, dass ein diagnostischer Test (z.B. Poolwert) genutzt wird, um zwischen zwei sich gegenseitig ausschließenden Zuständen (ungestört vs. gestört) zu unterscheiden (Greiner et al. 2000).

Die Sensitivität, Spezifität, die AUC und die ROC-Kurve sind konstante Eigenschaften des Tests und unabhängig von der Prävalenz, wohingegen die prädiktiven Werte abhängig sind von der Prävalenz der Erkrankung in der untersuchten Population (Greiner et al. 2000; Dohoo et al. 2003).

Die Sensitivität beschreibt hier den Anteil an Herden mit Testergebnissen über einem bestimmten Grenzwert, die durch den Test als korrekt positiv erkannt werden. Die Spezifität beschreibt den Anteil an Herden mit Testergebnissen unter einem bestimmten Grenzwert, die durch den Test als korrekt negativ erkannt werden. Ohne Angabe der Sensitivität und der Spezifität lassen sich die Wahrscheinlichkeiten der vier möglichen Testergebnisse (Richtig-Positiv, Richtig-Negativ, Falsch-Positiv, Falsch-Negativ) nicht beschreiben. Sensitivität und Spezifität verhalten sich reziprok zueinander. Bei Anheben des Grenzwertes steigert man die Spezifität zu Ungunsten der Sensitivität (Martin 1984).

Die empfohlenen Cutpoints aus Tabelle 50 und 51 wurden durch das Programm MedCalc ausgegeben und stellen den Punkt mit der höchsten Summe aus Sensitivität und Spezifität auf der ROC-Kurve dar. Die prädiktiven Werte eines Testes beschreiben die Wahrscheinlichkeiten, dass eine positiv getestete Herde auch wirklich positiv ist bzw. eine negativ getestete Herde auch wirklich negativ ist unter Beachtung der wahren Prävalenz. Bei geringer Prävalenz der Erkrankung kommt es zu größeren Veränderungen des positiven prädiktiven Wertes gegenüber kleineren Veränderungen der Prävalenz. Bei hoher Prävalenz der Erkrankungen kommt es zu kleineren Veränderungen des positiven prädiktiven Wertes gegenüber größeren Veränderungen der Prävalenz (Farver 2008). Für den negativen prädiktiven Wert gilt das Gegenteil. Dies konnte exemplarisch an zwei Cutpoints aus der ROC-Kurvenanalyse bestätigt werden (Abb. 43 und 44).

Die prädiktiven Werte sollten mit der wahren Prävalenz verglichen werden. Die Differenz zwischen dem prädiktiven Wert und der wahren Prävalenz ist der eigentliche Informationsgewinn durch den Test (Duffield 2000). Bei einer wahren Prävalenz von 30% einer Erkrankung gibt es eine 30%ige Chance, dass irgendeine zufällig ausgewählte Herde ohne Verwendung eines Tests diese Erkrankung aufweist. Weist ein diagnostischer Test einen positiven prädiktiven Wert von 60% auf, so beträgt hier der zusätzliche Informationsgewinn durch den Test 30%.



Die AUC fasst die ROC-Kurve als ganzes zusammen, wobei relevante und irrelevante Teile der Kurve berücksichtigt werden (Greiner et al. 2000). Die AUC unterscheidet demnach nicht zwischen dem Gewicht von Sensitivität oder Spezifität (unterschiedliche Abschnitte der Kurve). Im Allgemeinen unterscheidet man zwischen nicht informativen ( $AUC = 0,5$ ), wenig akkuraten ( $0,5 < AUC \leq 0,7$ ), mäßig akkuraten ( $0,7 < AUC \leq 0,9$ ), hoch akkuraten ( $0,9 < AUC < 1$ ) und perfekten Tests ( $AUC = 1$ ) (Swets 1988). Mit wenigen Ausnahmen liegen die AUC-Werte in der eigenen Untersuchung im hoch akkuraten Bereich (Tab. 50 und 51).

Die diagnostischen Eigenschaften der Cutpoints sind maßgeblich, um die Wahrscheinlichkeit falscher Testergebnisse einschätzen zu können. Die Wahl des Grenzwertes zwischen gesund und krank für einen diagnostischen Test hängt von der Konsequenz für ein falsch-positives oder ein falsch-negatives Testergebnis, von der Prävalenz der Erkrankung und der Untersuchungsfrequenz ab (Carrier et al. 2004). Prinzipiell sollten die Grenzwerte zur einmaligen Stoffwechseluntersuchung auf Herdenebene (Screening) eine hohe Sensitivität aufweisen, da die Bedeutung der Falsch-Negativen höher zu bewerten ist. Die angegebenen Cutpoints der gepoolten Proben zur Identifikation der gestörten Herden haben eine ausreichend hohe Sensitivität, um dem gerecht zu werden. Verwendet man beispielsweise den Cutpoint der BHB von 1,1mmol/l (Se 90,6%; Sp 92,3%) zur Identifikation von gestörten Herden (mehr als 2 Tiere mit BHB  $>1,2$ mmol/L), dann sind bei 100 Herden 10 Herden dabei, die der Test als verdächtig beurteilt, obwohl sie gestört sind bzw. 8 Herden dabei, die der Test als gestört beurteilt, obwohl sie verdächtig sind.

#### **5.4.8.5. Gegenüberstellung der Methoden zur Ermittlung von Referenzwerten für gepoolte Serumproben der NEFA und der BHB**

Die Ermittlung von Referenzwerten für gepoolte Serumproben erfolgte unter Anwendung von zwei Methoden. Zum einen wurden parametrische und nicht-parametrische Streuungsmaße verwendet und zum anderen die ROC-Kurvenanalyse.

Die Streuungsmaße liefern einen Bereich, indem ein gewisser Prozentsatz der Poolwerte der Herden aus der Referenzpopulation liegt. Dieser Bereich umfasst hier die zentralen 95% ( $\bar{x} \pm 2s$  bzw. 2,5%- und 97,5%-Perzentile) und 68% ( $\bar{x} \pm 1s$  bzw. 16%- und 84%-Perzentile). Die Unterschiede zwischen den parametrischen und den nicht-parametrischen Streuungsmaßen sind auf Grund der Nähe zur Normalverteilung zu vernachlässigen.

Die Streuungsmaße funktionieren im Gegensatz zur ROC-Kurvenanalyse ohne Kenntnis der Lage der Verteilungsfunktion der kranken Herden. Sie arbeiten mit Wahrscheinlichkeiten für den Fehler erster und zweiter Art (Abb. 45).

Referenzgrenze I $\bar{x} + 1s$ 84%-Perzentil		Referenzgrenze II $\bar{x} + 1,96s$ 97,5%-Perzentil	
<b>gesund</b>	<b>verdächtig</b>		<b>gestört</b>
Fehler erster Art $\alpha$ Risiko für Falsch-Positive Beurteilung einer Herde		Fehler zweiter Art $\beta$ Risiko für Falsch-Negative Beurteilung einer Herde	

Abbildung 45: Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels der Herde in der ersten Woche p.p. durch Streuungsmaße

Dabei gelingt die Trennung zwischen gesunden und kranken Herden, umso besser je weniger Schnittmenge die Verteilungsfunktionen untereinander haben.

Die ROC-Kurve liefert einen Grenzwert zur Trennung von zwei Populationen mit den entsprechenden diagnostischen Eigenschaften (AUC, Sensitivität, Spezifität). Bei der Verwendung der ROC-Kurve war eine Einteilung in ungestörte, verdächtige und gestörte Herden notwendig (Abb. 46).

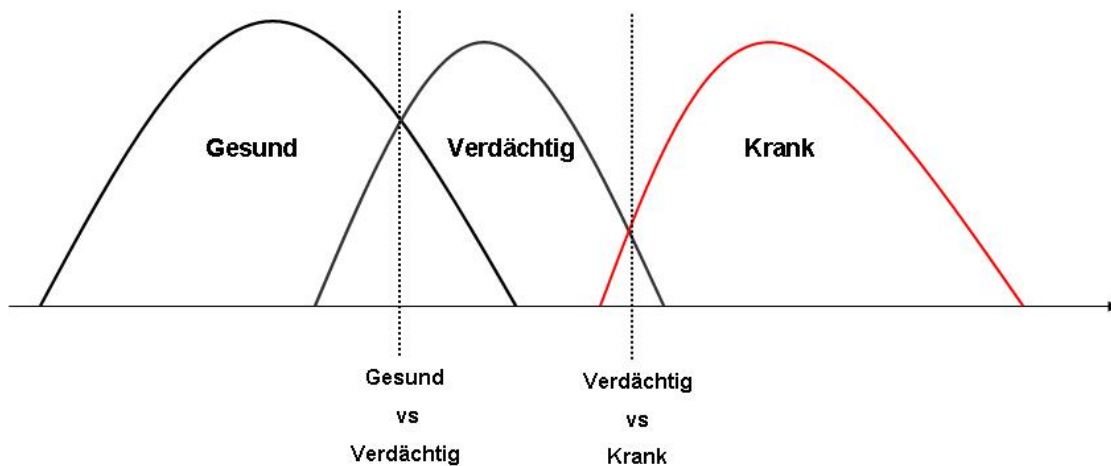


Abbildung 46: Schematische Abbildung zur Einteilung der Herden für die ROC-Kurvenanalyse

Die Auswahl der Grenzwerte geschieht hier willkürlich basierend auf der gewünschten Sensitivität und Spezifität. Auch hier gilt, dass die gesamte Testqualität (AUC) umso besser ist, je weniger Schnittmenge die zwei zu trennenden Populationen haben.

Obwohl zwei völlig verschiedene Methoden zur Ermittlung der Referenzwerte verwendet wurden, sind die Unterschiede nur geringfügig (Tab. 54 und 55). Bei Gegenüberstellung der Grenzwerte aus der ROC-Kurvenanalyse zur Trennung zwischen gesund und verdächtig mit den entsprechenden parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen ( $\bar{x} + 1s$  bzw. 84%) liegen die Differenzen

in einem Bereich von unter 0,06mmol/l für die NEFA und die BHB. Die Streuungsmaße sind demnach nur geringfügig höher.

Tabelle 54: Gegenüberstellung der Referenzwerte aus der ROC-Kurvenanalyse und den parametrischen und nicht parametrischen Streuungsmaßen für die NEFA

Referenzwert Einzeltier	ROC GvsV <sup>1</sup>	Par <sup>2</sup> $\bar{x} + 1s$	N-Par <sup>3</sup> 84%	ROC VvsK <sup>4</sup>	Par <sup>2</sup> $\bar{x} + 1,96s$	N-Par <sup>3</sup> 97,5%
0,6mmol/l	0,34	0,37	0,38	0,49	0,46	0,44
0,8mmol/l	0,44	0,44	0,43	0,65	0,55	0,58
1,0mmol/l	0,48	0,54	0,54	0,78	0,67	0,66
1,2mmol/l	0,59	0,61	0,60	0,85	0,77	0,73
1,4mmol/l	0,66	0,68	0,68	1,06	0,86	0,92

<sup>1</sup> GvsV = gesund vs. verdächtig

<sup>2</sup> Par = parametrisches Streuungsmaß

<sup>3</sup> N-Par = nicht-parametrisches Streuungsmaß

<sup>4</sup> VvsK = verdächtig vs Krank

Bei Gegenüberstellung der Grenzwerte aus der ROC-Kurvenanalyse zur Trennung zwischen verdächtig und krank mit den entsprechenden parametrischen und nicht-parametrischen Streuungsmaßen ( $\bar{x} + 1,96s$  bzw. 97,5%) liegen die Differenzen in einem Bereich von unter 0,12mmol/l für die NEFA und 0,15mmol/l für die BHB. Die Streuungsmaße sind hier niedriger.

Tabelle 55: Gegenüberstellung der Referenzwerte aus der ROC-Kurvenanalyse und den parametrischen und nicht parametrischen Streuungsmaßen für die BHB

Referenzwert Einzeltier	ROC GvsV <sup>1</sup>	Par <sup>2</sup> $\bar{x} + 1s$	N-Par <sup>3</sup> 84%	ROC VvsK <sup>4</sup>	Par <sup>2</sup> $\bar{x} + 1,96s$	N-Par <sup>3</sup> 97,5%
1,0mmol/l	0,68	0,71	0,74	0,85	0,84	0,81
1,2mmol/l	0,75	0,79	0,78	1,10	0,93	0,99
1,4mmol/l	0,84	0,87	0,87	1,18	1,03	1,06

<sup>1</sup> GvsV = gesund vs. verdächtig

<sup>2</sup> Par = parametrisches Streuungsmaß

<sup>3</sup> N-Par = nicht-parametrisches Streuungsmaß

<sup>4</sup> VvsK = verdächtig vs Krank

Die Ergebnisse der ROC-Kurvenanalyse und die Streuungsmaße stellen unter Einbeziehung der zur Verfügung stehenden Referenzwerte für das Einzeltier bereit. Nach Auswahl eines Einzeltierreferenzwertes können die Grenzwerte für die Poolproben bei einer Stichprobengröße von  $n = 10$  aus den Tabellen 50 und 51 (ROC) und den Tabellen 45 und 46 (Streuungsmaße) abgelesen werden. Als Entscheidungsgrundlage für die Auswahl der Einzeltierreferenzwerte sollten entweder

individuelle Ansprüche und Erfahrungen oder die aus der Literatur beschriebenen Risikomaße (Tab. 11 und 12) herangezogen werden.

Die ROC-Kurvenanalyse bietet insofern den Vorteil, als dass man die Ausprägung der vier möglichen Testergebnisse (Richtig-Positiv, Richtig-Negativ, Falsch-Positiv, Falsch-Negativ) ablesen kann und Aussagen über die diagnostischen Eigenschaften des Tests treffen kann.

### 5.5. Hinweise zur Interpretation von Stoffwechseluntersuchungen unter Verwendung von gepoolten Serumproben der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum

Vom Grundsatz stellt der Poolwert der NEFA und der BHB in der ersten Woche post partum ein Risikomaß für die erfolglose Adaptation des Energie- und Fettstoffwechsels im Zusammenhang mit den metabolischen Herausforderungen des Laktationsstartes dar. Das Risikopotential für peripartale Erkrankungen und Fruchtbarkeitsstörungen in einer Herde ist erhöht, wenn der Poolwert vom erwarteten Mittelwert abweicht.

Unabhängig von der Herleitung dienen die zwei Referenzgrenzen zur besseren Quantifizierung der Abweichung des Poolwerts (Abb. 47). Bei Unterschreiten der ersten Referenzgrenze ist es sehr unwahrscheinlich, dass sich eine pathophysiologisch relevante Anzahl an Tieren mit abnormen Werten in der Gruppe befindet. Befindet sich der Poolwert zwischen den beiden Referenzgrenzen, dann gibt es zwei mögliche Ursachen für die Abweichung. Entweder die Herde ist ungestört, aber es befinden sich auf Grund der normalen biologischen Variation ein bis zwei Tiere mit abnormen Werten in der Stichprobe oder die Herde ist gestört, aber die Abweichung ist in einem moderaten Bereich. Zum Ausschluss einer Störung müssen andere Informationskomplexe herangezogen werden. Bei Überschreiten der zweiten Referenzgrenze ist es sehr wahrscheinlich, dass eine nicht zu tolerierende Anzahl an Tieren in der Herde die Adaptation nicht erfolgreich bewältigt hat und einem erhöhten Krankheitsrisiko ausgesetzt ist.

Referenzgrenze I		Referenzgrenze II
<b>gesund</b>	<b>verdächtig</b>	<b>gestört</b>
geringes Risiko für Adaptationsstörung	moderates Risiko für Adaptationsstörung	hohes Risiko für Adaptationsstörung
	<b>Absicherung durch andere Informationskomplexe</b> (z.B. Körperkondition, Milchhaltsstoffe) UND/ODER zusätzliche Probenentnahme	<b>Nutzung anderer Informationskomplexe zur Ursachenfindung</b>

Abbildung 47: Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels der Herde in der ersten Woche p.p. durch zwei Referenzgrenzen der NEFA und der BHB

Im folgenden soll nun kurz auf die Kombination der drei möglichen Ausprägungen (gesund, verdächtig, gestört) der NEFA- und der BHB-Poolwerte, sowie die anderen Informationskomplexe im Rahmen der Bestandsbetreuung eingegangen werden.

Zum besseren Verständnis sei hier noch einmal auf ein paar labordiagnostische und pathophysiologische Grundsätze verwiesen. Die gemessene Konzentration eines Metaboliten im Blut ist im Grunde immer abhängig vom Zufluss und der Verwertung. Die Lipomobilisation mit den anfallenden NEFA ist eine essentielle Voraussetzung für das Erreichen einer hohen Milchleistung (Bauman und Currie 1980). Der Zufluss der NEFA speist sich zum größten Teil aus der körpereigenen Mobilisation von Fett und nur zu einem geringen Teil aus der Aufnahme von Nahrungsfetten. Die Verwertung der NEFA erfolgt hauptsächlich in der Leber (Oxidation, Lipogenese, Ketogenese) und der Milchdrüse (Milchfettsynthese) und nur zu einem geringen Teil durch andere Gewebe (Bell 1995). Daraus resultierend kann es nur bei ausgeprägter Lipomobilisation und inadäquater Verwertung zu hohen NEFA-Konzentrationen kommen (Ingvarsen 2006). Unabhängig von der homöostetischen Bereitstellung der Fettreserven in der Früh lactation wird die Lipolyse auch durch Catecholamine gefördert. Bei ausgeprägtem Stress vor der Probenentnahme kann dieser Umstand zu verfälschten Ergebnissen führen (Brickner et al. 2007). Andererseits ist das aber auch der Grund für den negativen Einfluss management-bedingter Stressoren (z.B. häufige Gruppenwechsel, Überbelegung, ausgeprägte Rankämpfe innerhalb der Gruppen) auf die erfolgreiche Bewältigung der Transitphase (Ingvarsen 2006).

Die Konzentration der BHB wird definiert durch den Zufluss aus hepatogener und ruminogener Ketogenese und der Verwertung durch verschiedene Organe (Herdt 2000a). Bei Ausschluss der ruminogenen Ketogenese sind die Ketonkörper ein Indikator für die Vollständigkeit der Oxidation der NEFA in der Leber (Duffield und LeBlanc 2006).

Sowohl für die NEFA, als auch für die BHB ist eine ausgeprägte Tagesdynamik beschrieben, die in großer Abhängigkeit zur Fütterung steht (Nielsen et al. 2003; Plaizier et al. 2005; Wylie et al. 2008). Vom Grundsatz her haben die NEFA bei TMR-Fütterung einen peak unmittelbar vor der ersten Futtevorlage und die BHB ungefähr 4 Stunden danach (Oetzel 2004). Dies konnte in den eigenen Untersuchungen bestätigt werden. Die Tagesdynamik ist umso ausgeprägter, je diskontinuierlicher das Futter vorliegt (Sutton et al. 1988; Bitman et al. 1990).

Prinzipiell sollte bei Vorliegen einer Hyperketonämie immer geklärt werden, ob dies aus der hepatogenen, der ruminogenen Ketogenese oder einer Kombination aus beiden resultiert. Die pathophysiologisch relevante Form der ruminogenen Ketogenese beruht entweder auf der Aufnahme Butyrat-haltiger Futtermittel oder auf der mikrobiellen Produktion von Butyrat im Reticulorum (Ingvarsen 2006). Mehr als 50% des Butyrats wird bei der Absorption durch das Pansenepithel in BHB umgewandelt (Hird und Symons 1961). Der Rest des Butyrats wird in der Leber oxidiert oder zur hepatogenen Ketogenese genutzt. Durch Depression der Futteraufnahme können Butyrat-haltige Futtermittel ebenfalls zur Hyperketonämie beitragen, indem sie die hepatogene Ketogenese durch

verstärkte Lipomobilisation fördern. Die Futteraufnahmedepression wird wahrscheinlich durch biogene Amine (Tryptamin, Cadaverin und Histamin) hervorgerufen (Lingaas und Tveit 1992; Tveit et al. 1992). Daher ist die sensorische Überprüfung der Rationskomponenten ein obligater Bestandteil der Bestandsbetreuung und sollte idealerweise durch eine Futtermittelanalyse zur Beurteilung der ernährungsphysiologischen Kenndaten einer Ration ergänzt werden.

Die Kombination der beiden Parameter NEFA und BHB mit den drei Ausprägungsmöglichkeiten lässt neun Möglichkeiten zu. Diese Kombinationen sind in Tabelle 56 dargestellt.

Tabelle 56: Hinweise zur Interpretation der gepoolten Serumproben der NEFA und der BHB in der ersten Woche p.p.

Parameterausprägung <sup>1</sup>				Interpretation	Nutzung anderer Informationskomplexe	
1	NEFA	↑	BHB	↑	Adaptationsstörung des Energie und Fettstoffwechsels	Milchleistung; Milchinhaltsstoffe <b>Konditionsentwicklung</b> TM-Aufnahme (a.p.) und <b>NEFA a.p.</b>
2	NEFA	↑	BHB	↓	Lipomobilisation Stress Probenentnahme	Milchleistung; Milchinhaltsstoffe Konditionsentwicklung evtl. erneute Probenentnahme
3	NEFA	↑	BHB	→	siehe 2	siehe 2
4	NEFA	↓	BHB	↑	Lipomobilisation Ruminogen	<b>Futtermittelanalyse</b> Milchleistung; Milchinhaltsstoffe Konditionsentwicklung
5	NEFA	→	BHB	↑	siehe 4	siehe 4
6	NEFA	→	BHB	→	normale biol. Variation geringe Störung	Milchleistung; Milchinhaltsstoffe Konditionsentwicklung
7	NEFA	→	BHB	↓	siehe 6	siehe 6
8	NEFA	↓	BHB	→	siehe 6	siehe 6
9	NEFA	↓	BHB	↓	erfolgreiche Adaptation geringes Leistungsniveau?	<b>Milchleistung</b> Kondition zum Abkalben

<sup>1</sup> ↓ ungestört → verdächtig ↑ gestört

Überschreiten sowohl die NEFA, als auch die BHB den oberen Grenzwert scheint eine ausgeprägte Adaptationsstörung vorzuliegen. Die Verwertungskapazität für die NEFA ist überschritten und das anfallende Acetyl-CoA wird zur Ketogenese genutzt.

Zusätzliche Hinweise in diesem Zusammenhang liefern auf Herdenebene die Milchleistung, die Milchinhaltsstoffe, die Konditionsbeurteilung, Trockenmasseaufnahme und weitere labordiagnostische Maßnahmen.

Die ausgeprägte postpartale Lipolyse wirkt sich positiv auf die Milchfettleistung aus (Staufenbiel et al. 1990). Daneben führt eine nicht bedarfsgerechte Energie- und Trockenmasseaufnahme zu einer reduzierten bakteriellen Proteinsynthese im Pansen und somit zu einer verringerten Eiweißkonzentration in der Milch. Schließlich führt der Blut-Glukosemangel zu einer niedrigeren Laktosesynthese, was eine Verringerung der Milchmenge und dadurch eine Konzentrierung der

Inhaltsstoffe verursacht (Spohr et al. 1992). Insgesamt resultiert daraus ein weiteres Fett/Eiweiß-Verhältnis (F/E). Der Referenzbereich liegt zwischen 1 und 1,5, wobei der optimale Bereich zwischen 1 und 1,25 einzuordnen ist (Spohr et al. 1992). Duffield (2004) nennt als obere Grenze 1,33 beim F/E zur Identifizierung der subklinischen Ketose. Für Cook et al. (2006a) stellt die Ketose ein Herdenproblem dar, wenn bei der ersten Milchleistungsprüfung mehr als 40% der Tiere ein F/E von  $>1,4$  aufweisen.

Für Reist et al. (2002) waren das Fett/Laktose-Verhältnis ( $r = -0,589$ ), gefolgt vom Milchfett ( $r = -0,565$ ) und F/E ( $r = -0,496$ ), der aussagekräftigste Parameter der Milchinhaltsstoffe bezüglich der Energiebilanz.

Die Information über das Ausmaß und die Länge der NEB kann über die Konditionsabnahme bzw. durch den Wechsel von Körpermasseabnahme zu -aufbau abgeleitet werden (Schröder und Staufenbiel 2006b). Die Konditionsbeurteilung einer Herde erfolgt durch das Body-Condition-Scoring oder durch die ultrasonographische Messung der Rückenfettdicke, wobei letzteres eine größere Objektivität aufweist (Schröder und Staufenbiel 2006b). Das Maß und die Geschwindigkeit der Rückenfettdickeänderung sowie die absoluten RFD-Werte zum Kalbezeitpunkt und zum konditionellen Tiefpunkt sind hier von besonderem Interesse. Die optimale Kondition von trockenstehenden Kühen liegt bei 19 bis 27mm RFD (BCS 3,0 bis 3,5) und von hochtragenden Färsen bei 15 bis 20mm RFD (BCS 2,5 bis 3,0). In der Trockenstehphase sollte die Kondition konstant bleiben. Der maximale Konditionsverlust in der Früh lactation sollte 10mm nicht überschreiten (Schröder und Staufenbiel 2006b).

Die Trockenmasseaufnahme ist ein wertvoller Parameter zur Überwachung der Transitphase. Insbesondere eine unangemessene Futteraufnahme in der Vorbereiter-Gruppe ( $< 12\text{kg TM/d}$ ) ist verbunden mit einem erhöhten Risiko für postpartale Erkrankungen (Duffield 2004). Kühe, die post partum an einer Metritis oder SCK erkranken, zeigten schon ante partum eine reduzierte Futteraufnahme (Huzzey et al. 2007; Goldhawk et al. 2009). Die Erfassung der TM-Aufnahme bereitet in praxi allerdings große Schwierigkeiten (Reist et al. 2002).

Die antepartale Messung der NEFA in der letzten Woche vor der Geburt liefert wertvolle Hinweise, ob sich das Energiedefizit schon auf den Zeitraum vor der Kalbung ausdehnt (Oetzel 2004; LeBlanc 2006). Hier werden Grenzwerte von  $0,4\text{mmol/l}$  bzw.  $0,5\text{mmol/l}$  für das Einzeltier genannt, welche mit einem erhöhten Risiko für postpartale Erkrankungen verbunden sind (Oetzel 2004; Van Saun 2004; LeBlanc et al. 2005). Aktuelle Referenzwerte für die antepartale Verwendung von gepoolten Proben der NEFA fehlen.

Die wichtigsten Maßnahmen zur Prävention metabolischer Störungen auf Herdenebene in der Transitphase sind die optimale Konditionsführung, das Vermeiden exzessiver Mobilisation körpereigener Reserven, die Minimierung von Stress und die Aufrechterhaltung einer hohen TM-Aufnahme (Ingvarsen 2006).

Bei gegensätzlichem Verhalten der NEFA und der BHB kommen zwei wesentliche Möglichkeiten in Betracht. Der Poolwert für die NEFA überschreitet den oberen Cutpoint, während die BHB dies nicht tut. In diesem Fall sollten folgende beiden Faktoren berücksichtigt werden, die zu einer falschen Messung führen können. Zum einen die Art und Weise der Probenentnahme (z.B. übermäßiger Stress bei der Entnahme) und zum anderen der Probenentnahmezeitpunkt (z.B. Entnahme vor der ersten Futtermahlzeit). Liegen Hinweise für die Beteiligung einer der beiden Faktoren vor, sollte die Probenentnahme wiederholt werden. Andererseits können isolierte Erhöhungen der NEFA aus pathophysiologischer Sicht auch Hinweis für ein schlechtes Fütterungsregime (z.B. diskontinuierliche Futtermahlzeit) und vermehrten Stress sein. Beides unterstützt die Lipomobilisation. Insbesondere das Fütterungsmanagement ist zu überprüfen und die oben genannten Informationskomplexe sollten genutzt werden, um zu klären, inwieweit hier eine ausgeprägte Störung vorliegt.

Überschreitet der Poolwert der BHB den oberen Cutpoint, während dies für die NEFA nicht zutrifft, sollte auf jeden Fall die ruminogene Ketogenese als Problem ausgeschlossen werden.

Eine Hyperketonämie in der ersten Woche post partum, ohne erhöhte Konzentrationen der NEFA deutet dennoch auf einen pathophysiologischen Zustand hin mit einer inadäquaten Lipomobilisation, da unter Ausschluss der ruminogenen Ketogenese, die Ketogenese in der Leber sich hauptsächlich aus dem Acetyl-CoA aus der  $\beta$ -Oxidation speist. Die subklinischen Ketose in der Frühaktation stellt einen wesentlichen Prädispositionsfaktor für weitere Gesundheits- und Fruchtbarkeitsstörungen dar (Walsh et al. 2007; Duffield et al. 2009). Die geringe Konzentration der NEFA ist die Reflexion der besseren Verwertung durch die Leber und das Euter. Es sollten auch hier die oben beschriebenen Informationskomplexe genutzt werden.

Bei Unterschreiten des unteren Cutpoints durch beide Parameter ist das Risiko für eine Adaptationsstörung des Energie- und Fettstoffwechsels sehr gering. Dieser Umstand ist sehr zufriedenstellend, wenn die realisierte Milchleistung auch den Erwartungen der modernen Hochleistungskuh entspricht.

Befinden sich beide Parameter im verdächtigen Bereich, dann sollten die oben benannten Informationskomplexe (Milchleistung, Milchinhaltsstoffe, Körperkondition) zur Absicherung genutzt werden, um eine Störung auszuschließen. Zusätzlich besteht die Möglichkeit eine weitere Stichprobe zu entnehmen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass die gepoolten Serumproben geeignet sind, um den diagnostischen Prozess bei der Herdenüberwachung zu unterstützen. Sie ermöglichen damit die Verwendung einer Kombination aus einer großen Tierzahl und einer Vielzahl an labordiagnostischen Parametern mit entscheidender Reduktion der Untersuchungskosten. Wesentliche Voraussetzung für die Anwendung von Poolproben ist die Formulierung von aktuellen Referenzbereichen. Die hier beschriebenen Verfahren bieten die Grundlagen dafür. Die sachgerechte Interpretation der Testergebnisse setzt ein gewisses Maß an biostatistischem, labordiagnostischem und vor allem pathophysiologischem Kenntnissen voraus. Vor dem Hintergrund der systematischen



Bestandsbetreuung ist allerdings zu beachten, dass die Labordiagnostik nur ein Element bei der Beurteilung einer Herde darstellt. Der Praktiker sollte auch andere Informationskomplexe (z.B. Körperkondition, Krankheitsinzidenzen, Abgangsraten, Fruchtbarkeitskennzahlen, Milchleistung, Milchinhaltsstoffe, Rationsanalysen) nutzen. Ein labordiagnostisches Testergebnis muss immer vor dem Hintergrund der aktuellen Problemsituation und in Kombination mit anderen Informationen beurteilt werden.

## 5.6. Schlussfolgerungen

Die Stoffwechselfeldiagnostik im Blut ist ein wichtiges Element in der Bestandsbetreuung von Milchvieherden. Die routinemäßige Überwachung der Stoffwechselgesundheit in der Transitperiode scheint besonders geeignet, um die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Laktation positiv zu beeinflussen, da in diesem Zeitraum die größten metabolischen Herausforderungen zu bewältigen sind. Hierbei ist die erfolgreiche Adaptation des Energie- und Fettstoffwechsels von zentraler Bedeutung. Die NEFA und die BHB stellen dabei die beiden wichtigsten diagnostischen Metaboliten dar, um das Risiko einer fehlgeschlagenen Adaptation einzuschätzen. Eine Auslenkung der NEFA und/oder der BHB geht einher mit einem erhöhten Risiko für Gesundheits-, Fruchtbarkeitsstörungen und Milchleistungsverlusten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sollen einen Beitrag für die adäquate Verwendung der NEFA und der BHB in der Stoffwechselüberwachung liefern. Daraus lassen sich folgende Empfehlungen ableiten:

1. Ein standardisiertes Vorgehen bei der Blutprobenentnahme und –verarbeitung wäre wünschenswert für eine hohe Qualität der Ergebnisse labordiagnostischer Untersuchungen. In der Rinderpraxis ist dies nur selten zu gewährleisten. Unbedingt zu vermeiden ist die Blutprobenentnahme aus der V. epigastrica cranialis superficialis. Obwohl die Einflüsse verschiedener Antikoagulanzen nicht so gravierend waren, sollten dennoch standardmäßig Serum-Röhrchen verwendet werden. Anderweitig sollte in Absprache mit dem entsprechenden Labor gehandelt werden. Zur Steigerung der Stabilität sollten die Proben nach der Entnahme zeitnah entweder zentrifugiert oder gekühlt gelagert werden. Die Zentrifugation ist als Verfahren zur Konservierung vorzuziehen. Ungekühlte Vollblutproben scheinen eine Lagerungsstabilität von wenigstens 12 Stunden und gekühlte Proben von wenigstens 24 Stunden aufzuweisen. Die Tiefgefrierung von Serum bietet eine längerfristige Möglichkeit zur Konservierung.
2. Eine ausgeprägte Tagesdynamik der NEFA und der BHB ist bereits unter verschiedenen Fütterungssystemen beschrieben und konnte in der eigenen Untersuchung in einer

Hochleistungsherde bei einmaliger TMR-Vorlage bestätigt werden. Die Ausprägung der Tagesdynamik war abhängig vom Laktationsstadium bzw. dem basalen Niveau. Bei alleiniger Anwendung der NEFA oder der BHB sollten die Blutproben jeweils zum erwarteten peak der Metaboliten genommen werden. Bei kombinierter Anwendung muss ein Kompromiss eingegangen werden. Die Beachtung der Tagesdynamik bzw. des Einflusses der ersten Futtevorlage ist ein wesentlicher Faktor bei einer Diskrepanz zwischen den Ergebnissen einer Stoffwechseluntersuchung und den Erwartungen des Untersuchers. Eine Wiederholung der Untersuchung zu einem anderen Zeitpunkt wäre hier empfehlenswert.

3. Der Fokus der Stoffwechselüberwachung unter Verwendung der NEFA und der BHB liegt in der Transitperiode. Im antepartalen Zeitraum sind nur die NEFA sinnvoll. Schwerpunkt ist hier die letzte Woche vor der Kalbung. Im postpartalen können beide Parameter verwendet werden. Der Einsatz der NEFA beschränkt sich hier auf die erste Woche post partum, wohingegen die BHB auch darüber hinaus eingesetzt werden kann. Die Inzidenz der SCK ist allerdings in den ersten beiden Laktationswochen am größten. Auf Grund der ausgeprägten Laktationsdynamik ist bei routinemäßigen Stoffwechseluntersuchungen eine strikte Einhaltung der Untersuchungszeiträume stets erforderlich und muss mit an die Laktationsdynamik angepassten Referenzwerten kombiniert werden.
4. Bei der Anwendung von Stichprobentestverfahren gibt es keine klinisch relevanten Differenzen zwischen dem arithmetischen Mittelwert und dem Poolwert einer Stichprobe.
5. Eine Stichprobenzahl von  $n = 10$  gestattet zuverlässige Aussagen über die Stoffwechselgesundheit. Diese ist ausreichend, um Abweichungen des Gruppenmittelwertes vom Normwert der stoffwechselgesunden Population ab dem einfachen Betrag einer Standardabweichung ( $\alpha = 0,05$ ) nachzuweisen. Gleichzeitig liefert der Poolwert auch zuverlässige Aussagen über den relativen Anteil an gestörten Tieren in der Stichprobe. Eine Unterschreitung der Stichprobengröße sollte vermieden werden, da der störende Einfluss von Ausreißern zunimmt. Bei kleinen Untersuchungsgruppen kann dies problematisch sein. Dies kann durch eine wiederholte Probenentnahme umgangen werden.
6. Es existiert eine starke Beziehung zwischen dem Poolwert und der Anzahl an gestörten Einzeltieren in der Stichprobe. Diese Beziehung kann negativ beeinflusst werden durch die unabsichtliche Integration von kranken Tieren in die Stichprobe bzw. durch die zufällige Integration von Tieren, die keine klinischen Symptome zeigen, aber dennoch stark ausgelenkte diagnostische Parameter aufweisen.

7. Bei der SCK lässt sich eine gleichgerichtete Auslenkung der Stoffwechselfparameter innerhalb einer Tiergruppe beobachten. Dies ist die grundlegende Voraussetzung für die Durchführung der Stoffwechselüberwachung unter Verwendung von Stichprobentestverfahren. Der Poolwert gibt die Auslenkung der diagnostischen Parameter wieder.
8. Der Erfolg und die Effizienz von Stoffwechseluntersuchungen im allgemeinen ist zu einem großen Teil abhängig von der Qualität der Referenzwerte und der Fähigkeit des Anwenders die Ergebnisse richtig zu interpretieren. Die Verwendung von gepoolten Proben erfordert spezielle Referenzwerte, die sich von den Referenzwerten für das Einzeltier grundlegend unterscheiden. Die hier verwendeten Verfahren zur Herleitung von Referenzwerten für Poolproben der NEFA und der BHB bieten eine Grundlage zur Erarbeitung von Referenzwerten für andere Parameter. Grundlegende Voraussetzung für die Anwendung ist die Kenntnis der Verteilungsfunktion und die diagnostische Fragestellung (einseitig unten/oben oder zweiseitig) des Parameters.
9. Unter der Annahme, dass ein hoher Anteil an Tieren mit erhöhten NEFA- und/oder BHB-Werten in der Früh lactation das Risiko für Gesundheitsstörungen und Milchleistungsverlusten erhöht, dient der Poolwert als kontinuierliches Risikomaß zur Überwachung der Stoffwechselgesundheit in der Transitperiode. Bei Verwendung von einer Stichprobenzahl von  $n = 10$  ist dies mit einer Reduktion der laboranalytischen Kosten um 90% verbunden.

## 6. Zusammenfassung

Die Stoffwechselüberwachung stellt ein wichtiges Element in der Bestandsbetreuung von Milchviehherden dar. Die Erkennung und das Vermeiden von subklinischen Stoffwechselstörungen stehen dabei im Vordergrund. Zu den häufigsten und ökonomisch bedeutsamsten Stoffwechselstörungen in der Transitperiode zählt die subklinische Ketose (**SCK**). Diese geht einher mit einem erhöhten Risiko für klinische Erkrankungen, sowie einer verminderten Reproduktions- und Milchleistung. Aus diagnostischer Sicht hat sich die Verwendung der nonesterified fatty acids (**NEFA**) und der  $\beta$ -Hydroxybuttersäure (**BHB**) bewährt, um Herden mit SCK als Bestandsproblem zu identifizieren. Dabei kommen Stichprobentestverfahren zur Anwendung. Die Auswertung erfolgt entweder über den arithmetischen Mittelwert einer Stichprobe oder über den Anteil an Tieren in der Stichprobe, die von einem Einzeltierreferenzwert abweichen. In beiden Fällen ist die individuelle Laboranalyse aller Tiere erforderlich. Die hohen Kosten sind einer der Gründe, warum routinemäßige Stoffwechseluntersuchungen nur wenig verbreitet sind. Der Gebrauch von gepoolten Proben stellt eine aussichtsreiche Methode dar, um diese Kosten zu reduzieren. Für die Effizienz und den Erfolg der Untersuchung sind die adäquate Auswahl der zu untersuchenden Tiere, die Probenverarbeitung, eine angemessene Stichprobengröße und die Qualität der Referenzwerte von übergeordneter Bedeutung. Bisher mangelt es an wissenschaftlicher Evidenz und Vertrauen in die Poolproben, so dass dieses Verfahren wenig anerkannt ist.

Ziel der Untersuchung war es wichtige präanalytische Einflussgrößen zu untersuchen, die Laktations- und Tagesdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode zu beschreiben, um letztendlich das diagnostische Potential gepoolter Stoffwechseluntersuchungen zu validieren.

Zur Beschreibung der präanalytischen Einflussgrößen wurde in sechs unterschiedlichen Versuchsdurchführungen der Einfluss der Tiefgefrierung, die Lagerungsstabilität von gekühltem und ungekühltem Serum, der Einfluss unterschiedlicher Antikoagulanzen, der Einfluss des Blutprobenentnahmeortes und die Lagerungsstabilität von gekühltem und ungekühltem Vollblut auf die Bestimmung der NEFA und der BHB untersucht. Es wurde bei 46 pluriparen Milchkühen die Laktationsdynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode untersucht. Weiterhin wurden Tagesprofile bei jeweils pluriparen zehn Kühen eine Woche a.p. und eine Woche p.p. durchgeführt. Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen ergeben sich folgende Empfehlungen:

Zur Steigerung der Stabilität sollten die Blutproben nach der Entnahme zeitnah entweder zentrifugiert oder gekühlt gelagert werden. Die Zentrifugation ist als Verfahren zur Konservierung vorzuziehen. Ungekühlte Vollblutproben scheinen eine Lagerungsstabilität von wenigstens 12 Stunden und gekühlte Proben von wenigstens 24 Stunden aufzuweisen. Die Tiefgefrierung von Serum bietet eine längerfristige Möglichkeit zur Konservierung. Die Blutprobenentnahme aus der V. epigastrica cranialis superficialis sollte vermieden werden.

Die NEFA und die BHB besitzen eine ausgeprägte Tages- und Laktationsdynamik. Die NEFA erreichten ihr Maximum unmittelbar vor der ersten Futtervorlage und sanken innerhalb von vier bis acht Stunden auf das niedrigste Niveau. Die Konzentrationsunterschiede innerhalb des postpartalen Tagesprofils der NEFA bieten einen Erklärungsansatz für Fehlinterpretationen in der Stoffwechsel-diagnostik. Bezogen auf die Laktationsdynamik kam es bei den NEFA zu einem graduellen Anstieg in der letzten Woche a.p. Im Anschluss kam es zu einem exponentiellen Anstieg zum Partus und nur geringgradigen Veränderungen in der ersten Woche p.p. Im Gegensatz dazu erreichte die BHB ihr Maximum vier bis acht Stunden nach der ersten Futtervorlage. Die Konzentrationsunterschiede innerhalb eines Tages waren nicht von klinischer Relevanz. Im Bereich der Transitphase änderte sich die mittlere Konzentration der BHB im antepartalen Zeitraum nicht. Zum Partus sank die BHB auf das niedrigste Niveau. Danach folgte ein kontinuierlicher Anstieg bis zum Versuchsende. Sowohl bei den NEFA als auch bei der BHB gab es allerdings starke tierindividuelle Unterschiede in der Ausprägung der Variation während eines Tages und im Laktationsverlauf.

Zur Evaluierung der gepoolten Serumproben wurden 278 Stoffwechseluntersuchungen von Milchviehherden ausgewertet. Dabei wurde in jeder Herde eine Blutprobe von maximal zehn pluriparen Kühen entnommen. In 110 Herden konnte eine Stichprobengröße von  $n = 10$  erreicht werden. Die Tiere waren klinisch unauffällig und befanden sich in der ersten Woche p.p. Neben der individuellen Analyse der Proben wurden auch gepoolte Proben der Stichproben auf den Gehalt an NEFA und BHB untersucht. Bei den 2298 untersuchten Einzeltieren lag die Prävalenz der SCK (BHB  $\geq 1,4\text{mmol/l}$ ) in der ersten Woche p.p. bei 15,8%. Die lineare Regressionsanalyse und der Bland-Altman-Methodenvergleich ergaben eine hohe Übereinstimmung zwischen dem Poolwert und dem arithmetischen Mittelwert der Stichprobe. Für die NEFA ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ) und die BHB ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ) ergab sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen den beiden Methoden. Die Übereinstimmungsgrenzen betragen für die NEFA  $-0,12/+0,13\text{mmol/l}$  und für die BHB  $-0,14/+0,15\text{mmol/l}$ . Es existiert eine starke Beziehung zwischen dem Poolwert und der Anzahl an gestörten Einzeltieren in der Stichprobe. Bei der SCK lässt sich eine gleichgerichtete Auslenkung der Stoffwechselfparameter innerhalb einer Tiergruppe beobachten. Der Poolwert gibt die Auslenkung der diagnostischen Parameter wieder. Unterschiedliche Verfahren wurden genutzt, um qualitativ hochwertige Referenzgrenzen für gepoolte Stoffwechseluntersuchungen unter Verwendung der NEFA und der BHB zu generieren. Unter der Annahme, dass ein hoher Anteil an Tieren mit erhöhten NEFA- und/oder BHB-Werten in der Früh-laktation das Risiko für Gesundheitsstörungen und Milchleistungsverlusten erhöht, dient der Poolwert von zehn zufällig ausgewählten klinisch gesunden Tieren als kontinuierliches Risikomaß zur Überwachung der Stoffwechselgesundheit in der Transitperiode. Die in dieser Arbeit verwendeten Verfahren zur Festlegung der Referenzgrenzen für die NEFA und die BHB können in Zukunft auch für weitere Laborparameter genutzt werden, um gepoolte Stoffwechseluntersuchungen als anerkanntes Diagnostikum in der Bestandsbetreuung von Milchviehherden zu etablieren.

## 7. Summary

### **Investigations on the use of NEFA and BHB for metabolic profiling of transition cows with special emphasis on pooled serum samples**

Metabolic profiling represents a key element for herd health investigations in dairy herds. Though, the detection and prevention of subclinical metabolic diseases has the main priority. Subclinical ketosis (**SCK**) is one of the most frequent and economic important metabolic diseases in the transition period. SCK is associated with increased risk for clinical diseases, impaired reproductive performance and reduced productivity. Metabolic profiling with nonesterified fatty acids (**NEFA**) and  $\beta$ -hydroxybutyrate (**BHB**) has become the mainstay in monitoring dairy herds for SCK. Therefore, random samples are used. Metabolic profile results can be interpreted as either individual mean values of the subgroup sampled or as the proportion of animals above or below a certain cutpoint within the subsample. Both procedures require the analysis of all individual samples. Although the use of metabolic profiling has been widely advocated, their acceptance has been limited as a result of high cost. Pooling samples provides an alternative to reduce laboratory costs. For the efficiency and the success of the pooled sample procedure the adequate sampling, sample handling, sample size and the quality of the reference criteria are most meaningful. However, scientific evidence is missing for accepting the pooled sample procedure.

Therefore the objectives of the study were to investigate the effects of different preanalytical procedures and to describe the diurnal and lactational variation of NEFA and BHB for validating the diagnostic potential of a pooled sample metabolic profile.

For describing the effects of different preanalytical procedures six experiments were performed to investigate the effect of freeze-thaw, storage temperature and time of serum and whole blood, anticoagulant, blood collection side on the concentrations of NEFA and BHB, respectively. Forty-six pluriparous dairy cows were sampled to describe the dynamics of NEFA and BHB in the transition period. Additionally, the diurnal variation of NEFA and BHB was investigated in ten pluriparous cows in the last week antepartum and the first week postpartum, respectively. Recommendations based on the results of these experiments are:

Blood samples should be either centrifugated or kept chilled for improving the storage stability. Centrifugation of blood samples is more important than storage temperature for conservation. Unchilled whole blood samples remain stable for at least 12 hours and chilled samples for at least 24 hours. Freezing serum samples can be used for long-term conservation. Blood sampling from the V. epigastrica cranialis superficialis should be avoided.

NEFA and BHB contain a pronounced diurnal and lactational variation. NEFA reached their peak just before the fresh feed was delivered. After four to eight hours the concentrations decreased to the lowest level. Disregarding the diurnal variation in the postpartum period could be a failure source for

misinterpretation of metabolic profiles. Based on lactation dynamics of NEFA, there was a gradual increase in the last week antepartum followed by an exponential increase at the time of parturition. Thereafter, small changes were observed in the first week postpartum.

In contrast, BHB reached its peak four to eight hours after fresh feed was delivered. The diurnal variation was not of clinical relevance. Based on lactation dynamics of BHB, average BHB concentration did not change antepartum. At the time of parturition BHB decreased to the lowest level and increased continuously until the end of the experiment. However, there were strong individual differences in the shape of the diurnal and lactational variation for NEFA and BHB, respectively.

For evaluating the pooled serum samples 278 metabolic profiles were performed. In each herd a maximum of ten pluriparous cows was sampled. In 110 herds a sample size of  $n = 10$  was reached. The animals sampled were clinically healthy and in the first week postpartum. A pooled sample was build by mixing aliquot volumes of the individual sera of each sample. NEFA and BHB concentrations were measured in individual and pooled serum samples. Regarding the 2298 individual animals, the prevalence of SCK ( $BHB \geq 1,4\text{mmol/l}$ ) was 15.8%. Linear regression analysis and Bland-Altman method comparison revealed a high agreement between the pool value and the arithmetic mean of the sample. There was highly significant correlation between the two methods for NEFA ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ) and BHB ( $r = 0,98$ ;  $p < 0,001$ ), respectively. The limits of agreement were  $-0,12/+0,13\text{mmol/l}$  and  $-0,14/+0,15\text{mmol/l}$  for NEFA and BHB, respectively. There is a strong relationship between the pool value and the number of abnormal animals in the sample. The pool value provides useful information about the deviation of diagnostic metabolites in an animal group with SCK. Different methods were used for generating reference criteria with high quality for a pooled sample procedure with NEFA and BHB. Based on the assumption that having a high proportion of cows with elevated NEFA and/ or BHBA concentrations in the fresh cow group increases the disease risk and the risk of impaired production the pool value of NEFA and BHBA from 10 randomly selected healthy animals in the first week postpartum could be regarded as a continuous measure of risk and provide useful information about the metabolic health of an animal group. The methods proposed in this study for generating reference criteria for pooled serum samples of NEFA and BHB can be used in the future for additional laboratory parameters for establishing the pooled sample metabolic profile as a reliable diagnostic approach for dairy herd health investigations.





## 8. Literaturverzeichnis

**Adler, B. (2009):**

Zuchtarbeit in Brandenburg - Ergebnisse und Herausforderungen.  
Milchrindtag, Götting, Deutschland.

**Ametaj, B. N.; Emmanuel, D. G.; Zebeli, Q.; Dunn, S. M. (2009):**

Feeding high proportions of barley grain in a total mixed ration perturbs diurnal patterns of plasma metabolites in lactating dairy cows.  
J Dairy Sci. 92(3), 1084-91.

**Andersen, J. B.; Larsen, T.; Nielsen, M. O.; Ingvarsen, K. L. (2002):**

Effect of energy density in the diet and milking frequency on hepatic long chain fatty acid oxidation in early lactating dairy cows.  
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 49(4), 177-83.

**Baird, G. D. (1982):**

Primary ketosis in the high-producing dairy cow: clinical and subclinical disorders, treatment, prevention, and outlook.  
J Dairy Sci. 65(1), 1-10.

**Bauman, D. E.; Currie, W. B. (1980):**

Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis.  
J Dairy Sci. 63(9), 1514-29.

**Beam, S. W.; Butler, W. R. (1999):**

Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows.  
J Reprod Fertil Suppl. 54, 411-24.

**Beauchemin, K. A.; Maekawa, M.; Christensen, D. A. (2002):**

Effect of diet and parity on meal patterns of lactating dairy cows.  
Can J Anim Sci. 82, 215-223.

**Bell, A. W. (1995):**

Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation.  
J Anim Sci. 73(9), 2804-19.

**Bertics, S. J.; Grummer, R. R.; Cadorniga-Valino, C.; Stoddard, E. E. (1992):**

Effect of prepartum dry matter intake on liver triglyceride concentration and early lactation.  
J Dairy Sci. 75(7), 1914-22.

**Bitman, J.; Wood, D. L.; Lefcourt, A. M. (1990):**

Rhythms in cholesterol, cholesteryl esters, free fatty acids, and triglycerides in blood of lactating dairy cows.  
J Dairy Sci. 73(4), 948-55.

**Bland, J.; Altman, D. (1986):**

Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.  
Lancet, 307 - 310.

**Bland, J. M.; Altman, D. G. (2003):**

Applying the right statistics: analyses of measurement studies.  
Ultrasound Obstet Gynecol. 22(1), 85-93.

**Block, S. S.; Butler, W. R.; Ehrhardt, R. A.; Bell, A. W.; Van Amburgh, M. E.; Boisclair, Y. R. (2001):**

Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance.  
J Endocrinol. 171(2), 339-48.

**Blum, J. W.; Bruckmaier, R. M.; Vacher, P. Y.; Munger, A.; Jans, F. (2000):**

Twenty-four-hour patterns of hormones and metabolites in week 9 and 19 of lactation in high-yielding dairy cows fed triglycerides and free fatty acids.  
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 47(1), 43-60.

**Bobe, G.; Young, J. W.; Beitz, D. C. (2004):**

Invited review: pathology, etiology, prevention, and treatment of fatty liver in dairy cows.  
J Dairy Sci. 87(10), 3105-24.

**Bossaert, P.; Leroy, J. L.; De Vliegher, S.; Opsomer, G. (2008):**

Interrelations between glucose-induced insulin response, metabolic indicators, and time of first ovulation in high-yielding dairy cows.  
J Dairy Sci. 91(9), 3363-71.

**Bradford, B. J.; Allen, M. S. (2008):**

Negative energy balance increases periprandial ghrelin and growth hormone concentrations in lactating dairy cows.  
Domest Anim Endocrinol. 34(2), 196-203.

**Bradford, B. J.; Oba, M.; Ehrhardt, R. A.; Boisclair, Y. R.; Allen, M. S. (2006):**

Propionate is not an important regulator of plasma leptin concentration in dairy cattle.  
Domest Anim Endocrinol. 30(2), 65-75.

**Brenner, K. V.; Reinhard, P. (1976):**

Untersuchungen zur photometrischen Bestimmung und zur Stabilität der Freien Fettsäuren im Plasma und Serum vom Rind.  
Monatsheft der Veterinärmedizin. 31, 707-711.

**Brickner, A. E.; Rastani, R. R.; Grummer, R. R. (2007):**

Technical note: Effect of sampling protocol on plasma nonesterified fatty acid concentration in dairy cows.  
J Dairy Sci. 90(5), 2219-22.

**Britt, J. H. (1992):**

Impacts of early postpartum metabolism on follicular development and fertility.  
The Bovine Practitioner Proc. 24, 39.

**Brumby, P.; Anderson, M.; Tuckley, B.; Storry, J.; Hibbit, K. (1974):**

Lipid metabolism in the cow during starvation induced ketosis.  
Biochem J. 146, 609-615.

**Butler, S. T.; Marr, A. L.; Pelton, S. H.; Radcliff, R. P.; Lucy, M. C.; Butler, W. R. (2003):**

Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A.  
J Endocrinol. 176(2), 205-17.

**Butler, W. R. (2003):**

Energy balance Relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows.  
Livestock Production Science. 83, 211 - 218.

**Butler, W. R.; Smith, R. D. (1989):**

Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle.  
J Dairy Sci. 72(3), 767-83.

**Carrier, J.; Stewart, S.; Godden, S.; Fetrow, J.; Rapnicki, P. (2004):**

Evaluation and use of three cowside tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows.  
J Dairy Sci. 87(11), 3725-35.

**Carson, M. (2008):**

The association of selected metabolites in peripartum dairy cattle with health and production.  
MSc Dissertation, University of Guelph.

**Chagas, L. M.; Bass, J. J.; Blache, D.; Burke, C. R.; Kay, J. K.; Lindsay, D. R.; Lucy, M. C.; Martin, G. B.; Meier, S.; Rhodes, F. M.; Roche, J. R.; Thatcher, W. W.; Webb, R. (2007):**

Invited review: New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows.  
J Dairy Sci. 90(9), 4022-32.

**Chelikani, P. K.; Ambrose, J. D.; Keisler, D. H.; Kennelly, J. J. (2004):**

Effect of short-term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle.  
Domest Anim Endocrinol. 26(1), 33-48.

**Cnop, M.; Hannaert, J. C.; Hoorens, A.; Eizirik, D. L.; Pipeleers, D. G. (2001):**

Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation.  
Diabetes. 50(8), 1771-7.

**Concordet, D.; Geffre, A.; Braun, J. P.; Trumel, C. (2009):**

A new approach for the determination of reference intervals from hospital-based data.  
Clin Chim Acta. 405(1-2), 43-8.

**Connor, T. J., N.P.; Herdt, T.H.; Neuder, L (2004):**

Association of prepartum plasma non-esterified fatty acid concentrations with postpartum metabolic diseases in Holstein cows.

23. World Buiatric Congress, Quebec, Canada.

**Cook, N.; Oetzel, G.; Nordlund, K. (2006):**

Modern techniques for monitoring high-producing dairy cows 1. Principles of herd-level diagnoses.

In Practice. 28(9), 510-515.

**Dann, H. M.; Douglas, G. N.; Overton, T. R.; Drackley, J. K. (2000):**

Carnitine Palmitoyltransferase activity in liver of periparturient dairy cows.

J Dairy Sci. 83(Suppl.I), 251.

**Dann, H. M.; Drackley, J. K. (2005):**

Carnitine palmitoyltransferase I in liver of periparturient dairy cows: effects of prepartum intake, postpartum induction of ketosis, and periparturient disorders.

J Dairy Sci. 88(11), 3851-9.

**Devries, T. J.; von Keyserlingk, M. A. (2005):**

Time of feed delivery affects the feeding and lying patterns of dairy cows.

J Dairy Sci. 88(2), 625-31.

**DeVries, T. J.; von Keyserlingk, M. A. (2006):**

Feed stalls affect the social and feeding behavior of lactating dairy cows.

J Dairy Sci. 89(9), 3522-31.

**DeVries, T. J.; von Keyserlingk, M. A.; Beauchemin, K. A. (2003):**

Short communication: Diurnal feeding pattern of lactating dairy cows.

J Dairy Sci. 86(12), 4079-82.

**DeVries, T. J.; von Keyserlingk, M. A.; Weary, D. M. (2004):**

Effect of feeding space on the inter-cow distance, aggression, and feeding behavior of free-stall housed lactating dairy cows.

J Dairy Sci. 87(5), 1432-8.

**Dewitte, K.; Fierens, C.; Stockl, D.; Thienpont, L. M. (2002):**

Application of the Bland-Altman plot for interpretation of method-comparison studies: a critical investigation of its practice.

Clin Chem. 48(5), 799-801; author reply 801-2.

**Dimauro, C.; Bonelli, P.; Nicolussi, P.; Rassu, S. P.; Cappio-Borlino, A.; Pulina, G. (2008):**

Estimating clinical chemistry reference values based on an existing data set of unselected animals.

Vet J. 178(2), 278-81.

**Dohoo, I.; Martin, S.; Stryhn, H. (2003):**

Sampling

In: I. Dohoo, S. Martin und H. Stryhn (Hrsg.); Veterinary Epidemiologic Research.

AVC Inc; Charlottetown, Canada, 27 - 52.

**Drackley, J. K. (1999):**

ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?  
J Dairy Sci. 82(11), 2259-73.

**Drackley, J. K. (2000):**

Use of NEFA as a tool to monitor energy balance in transition dairy cows.  
Illinois Dairy Days, Illinois, USA.

**Drackley, J. K.; Andersen, J. B. (2008):**

Splanchnic Metabolism of long-chain fatty acids in ruminants  
In: K. Sejrsen, T. Hvelplund und M. O. Nielsen (Hrsg.); Ruminant physiology.  
Wageningen Academic Publishers, Wageningen, Niederlande.

**Drackley, J. K.; Overton, T. R.; Douglas, G. N. (2001):**

Adaptations of Glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period.  
J Dairy Sci. 84(E. Suppl.), E100-E112.

**Duffield, T. (2000):**

Subclinical ketosis in lactating dairy cattle.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract. 16(2), 231-53, v.

**Duffield, T. (2005):**

Diagnosis, treatment and monitoring of ketosis.  
PennState Dairy Cattle Nutrition workshop  
Pennsylvania, USA

**Duffield, T.; LeBlanc, S. (2009):**

Interpretation of Serum Metabolic Parameters around the Transition Period.  
The Southwest Nutrition and Management Conference, Arizona, USA, S. 106-114.

**Duffield, T. F. (2004):**

Monitoring Strategies for metabolic disease in transitioning dairy cows.  
23rd World Buiatric Congress, Quebec, Canada, S. 34-35.

**Duffield, T. F.; LeBlanc, S. (2006):**

Metabolic profiling - indicators of metabolic imbalances.  
Cattle Consultancy Days, Denmark, S. 158-166.

**Duffield, T. F.; Lissemore, K. D.; McBride, B. W.; Leslie, K. E. (2009):**

Impact of hyperketonemia in early lactation dairy cows on health and production.  
J Dairy Sci. 92(2), 571-80.

**Duffield, T. F.; Sandals, D.; Leslie, K. E.; Lissemore, K.; McBride, B. W.; Lumsden, J. H.; Dick, P.; Bagg, R. (1998):**

Efficacy of monensin for the prevention of subclinical ketosis in lactating dairy cows.  
J Dairy Sci. 81(11), 2866-73.

**Dyk, P. B. E., R.S.; Liesman, J.L.; Buchholtz, H.F.; VandeHaar, M.J. (1995):**

Prepartum non esterified fatty acids in plasma are higher in cows developing periparturient health problems.  
J Dairy Sci. 78(Suppl 1), 264(Abstract).

**Ehsani, A.; Afshari, A.; Bahadori, H.; Mohri, M.; Seifi, H. A. (2008):**

Serum constituents analyses in dairy cows: effects of duration and temperature of the storage of clotted blood.  
Res Vet Sci. 85(3), 473-5.

**Emery, R. S.; Liesman, J. S.; Herdt, T. H. (1992):**

Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver.  
J Nutr. 122(3 Suppl), 832-7.

**Farver, T. (2008):**

Concepts of Normalty in Clinical Biochemistry

In: J. Kaneko, J. Harvey und M. Bruss (Hrsg.); *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*.  
Elsevier; New York, 6. Ausgabe, S. 1ff.

**Ferre-Masferrer, M.; Fuentes-Arderiu, X.; Puchal-Ane, R. (1999):**

Indirect reference limits estimated from patients' results by three mathematical procedures.  
Clin Chim Acta. 279(1-2), 97-105.

**Fürll, M. (1989):**

Vorkommen, Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik und medikamentelle Beeinflussung von Leberschäden beim Rind.

Dissertation, Univ. Leipzig.

**Fürll, M. (2005):**

Stoffwechselüberwachung bei Rindern

In: W. Kraft und U. Dürr (Hrsg.); *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*.  
Schattauer-Verlag; Stuttgart und New York, 5. Ausgabe, S. 459 ff.

**Fürll, M.; Kirbach, H.; Knobloch, B. (1993):**

Influence of glucocorticoids on lipolysis stimulated by fasting and liver function in cows.  
Tierärztl P. 21, 399-403.

**Geffre, A.; Friedrichs, K.; Harr, K.; Concordet, D.; Trumel, C.; Braun, J. P. (2009):**

Reference values: a review.

Vet Clin Pathol. 38(3), 288-98.

**Geishauser, T.; Leslie, K.; Duffield, T.; Edge, V. (1997):**

Evaluation of aspartate transaminase activity and beta-hydroxybutyrate concentration in blood as tests for prediction of left displaced abomasum in dairy cows.

Am J Vet Res. 58(11), 1216-20.

**Geishauser, T.; Leslie, K.; Kelton, D.; Duffield, T. (1998):**

Evaluation of five cow-side tests for use with milk to detect subclinical ketosis in dairy cows.

J Dairy Sci. 81(2), 438-43.

**Geishauser, T.; Leslie, K.; Kelton, D.; Duffield, T. (2001):**

Monitoring for subclinical ketosis in dairy herds.  
Compend Contin Educ Prac Vet. 23, S65 - S71.

**Gelfert, C.-C.; Staufenbiel, R. (1998):**

Sachgerechte Entnahme und Behandlung von Blutproben zur Sicherung zuverlässiger Ergebnisse in der Diagnose von Stoffwechselerkrankungen beim Rind.  
Prakt Tier. 79(7), 640-650.

**Gerloff, B. J. (2000):**

Dry cow management for the prevention of ketosis and fatty liver in dairy cows.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract. 16(2), 283-92.

**Gerloff, B. J.; Herdt, T. H. (1984):**

Hepatic lipidosis from dietary restriction in nonlactating cows.  
J Am Vet Med Assoc. 185(2), 223-4.

**Gleeson, M. (1987):**

Effect of heparin and storage on human plasma free fatty acid concentration.  
Clin Chim Acta. 169(2-3), 315-8.

**Goff, J. P.; Horst, R. L. (1997):**

Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders.  
J Dairy Sci. 80(7), 1260-8.

**Goldhawk, C.; Chapinal, N.; Veira, D. M.; Weary, D. M.; von Keyserlingk, M. A. (2009):**

Prepartum feeding behavior is an early indicator of subclinical ketosis.  
J Dairy Sci. 92(10), 4971-7.

**Greiner, M.; Pfeiffer, D.; Smith, R. D. (2000):**

Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests.  
Prev Vet Med. 45(1-2), 23-41.

**Grohn, Y. T.; Erb, H. N.; McCulloch, C. E.; Saloniemi, H. S. (1989):**

Epidemiology of metabolic disorders in dairy cattle: association among host characteristics, disease, and production.  
J Dairy Sci. 72(7), 1876-85.

**Grouven, U.; Bender, R.; Ziegler, A.; Lange, S. (2007):**

Vergleich von Messmethoden.  
Deutsche Med W. 132, e69 - e73.

**Grum, D. E.; Drackley, J. K.; Younker, R. S.; LaCount, D. W.; Veenhuizen, J. J. (1996):**

Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows.  
J Dairy Sci. 79(10), 1850-64.

**Grum, D. E.; Hansen, L. R.; Drackley, J. K. (1994):**

Peroxisomal beta-oxidation of fatty acids in bovine and rat liver.  
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 109(2-3), 281-92.

**Grummer, R. R. (1993):**

Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows.  
J Dairy Sci. 76(12), 3882-96.

**Grummer, R. R. (1995):**

Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow.  
J Anim Sci. 73(9), 2820-33.

**Grummer, R. R.; Mashek, D. G.; Hayirli, A. (2004):**

Dry matter intake and energy balance in the transition period.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract. 20(3), 447-470.

**Grummer, R. R.; Winkler, J. C.; Bertics, S. J.; Studer, V. A. (1994):**

Effect of propylene glycol dosage during feed restriction on metabolites in blood of prepartum Holstein heifers.  
J Dairy Sci. 77(12), 3618-23.

**Hachenberg, S.; Weinkauff, C.; Hiss, S.; Sauerwein, H. (2007):**

Evaluation of classification modes potentially suitable to identify metabolic stress in healthy dairy cows during the peripartal period.  
J Anim Sci. 85(8), 1923-32.

**Hammon, D. S.; Evjen, I. M.; Dhiman, T. R.; Goff, J. P.; Walters, J. L. (2006):**

Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders.  
Vet Immunol Immunopathol. 113(1-2), 21-9.

**Hammon, H. M.; Sturmer, G.; Schneider, F.; Tuchscherer, A.; Blum, H.; Engelhard, T.; Genzel, A.; Staufenbiel, R.; Kanitz, W. (2009):**

Performance and metabolic and endocrine changes with emphasis on glucose metabolism in high-yielding dairy cows with high and low fat content in liver after calving.  
J Dairy Sci. 92(4), 1554-66.

**Heitmann, R. N.; Dawes, D. J.; Sensenig, S. C. (1987):**

Hepatic ketogenesis and peripheral ketone body utilization in the ruminant.  
J Nutr. 117(6), 1174-80.

**Heitmann, R. N.; Fernandez, J. M. (1986):**

Autoregulation of alimentary and hepatic ketogenesis in sheep.  
J Dairy Sci. 69(5), 1270-81.

**Herdt, T. H. (1988):**

Fuel homeostasis in the ruminant.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract. 4(2), 213-31.



**Herd, T. H. (1997):**

"Plasma Nonesterified Fatty Acid Testing in the Evaluation of Dry Cow Nutrition."  
abgerufen am 20.06.2009, unter:<https://listserv.umd.edu/cgi-bin/wa?A2=ind9704&L=dairynew&P=1079>.

**Herd, T. H. (2000a):**

Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract. 16(2), 215-30, v.

**Herd, T. H. (2000b):**

Variability characteristics and test selection in herd-level nutritional and metabolic profile testing.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract. 16(2), 387-403.

**Herd, T. H.; van de Haar, M. J.; Liesman, J. S.; Bucholtz, H.; Dyk, P.; Emery, R. S. (1998):**

Distribution and variance characteristics of plasma nefa concentrations in late-gestation cows in commercial dairy herds.

10th Int. Conf. Prod. Dis. in Farm Anim. , Utrecht, Niederlande.

**Hird, F. J.; Symons, R. H. (1961):**

The mode of formation of ketone bodies from butyrate by tissue from the rumen and omasum of the sheep.  
Biochim Biophys Acta. 46, 457-67.

**Huzzey, J. M.; DeVries, T. J.; Valois, P.; von Keyserlingk, M. A. (2006):**

Stocking density and feed barrier design affect the feeding and social behavior of dairy cattle.  
J Dairy Sci. 89(1), 126-33.

**Huzzey, J. M.; Veira, D. M.; Weary, D. M.; von Keyserlingk, M. A. (2007):**

Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis.  
J Dairy Sci. 90(7), 3220-33.

**Ingvartsen, K. L. (2006):**

Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around calving and strategies to reduce feeding-related diseases.

Anim Feed Sci Tech. 126(3-4), 175-213.

**Ingvartsen, K. L.; Dewhurst, R. J.; Friggens, N. C. (2003):**

On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper.

Live Prod Sci. 83(2-3), 277-308.

**Iwersen, M.; Falkenberg, U.; Voigtsberger, R.; Forderung, D.; Heuwieser, W. (2009):**

Evaluation of an electronic cowside test to detect subclinical ketosis in dairy cows.

J Dairy Sci. 92(6), 2618-24.

**Jacobs, R. M.; Lumsden, J. H.; Grift, E. (1992):**

Effects of bilirubinemia, hemolysis, and lipemia on clinical chemistry analytes in bovine, canine, equine, and feline sera.

Can Vet J. 33(9), 605-608.

**Johannsen, U. F., M. ; Schäfer, M.; Ehrentraut, W.; Deckert, W.; Geinitz, D. (1991):**  
Untersuchungen zum Lipidgehalt und zur Funktion der Leber von Kühen in Abhängigkeit vom Laktationsstadium.  
Mon Vetmed. 46, 670 - 674.

**Jordan, E. R.; Fourdraine, R. H. (1993):**  
Characterization of the management practices of the top milk producing herds in the country.  
J Dairy Sci. 76(10), 3247-56.

**Jorritsma, R.; Cesar, M. L.; Hermans, J. T.; Kruitwagen, C. L.; Vos, P. L.; Kruip, T. A. (2004):**  
Effects of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cells and developmental potential of oocytes in vitro.  
Anim Reprod Sci. 81(3-4), 225-35.

**Jorritsma, R.; Jorritsma, H.; Schukken, Y. H.; Bartlett, P.; Wensing, T.; Wentink, G. H. (2001):**  
Prevalence and Indicators of post partum fatty infiltration of the liver in nine commercial dairy herds in the Netherlands.  
Live Prod Sci. 68(53-60).

**Jorritsma, R.; Jorritsma, H.; Schukken, Y. H.; Wentink, G. H. (2000):**  
Relationships between fatty liver and fertility and some periparturient diseases in commercial Dutch dairy herds.  
Therio. 54(7), 1065-74.

**Jorritsma, R.; Wensing, T.; Kruip, T. A.; Vos, P. L.; Noordhuizen, J. P. (2003):**  
Metabolic changes in early lactation and impaired reproductive performance in dairy cows.  
Vet Res. 34(1), 11-26.

**Kairisto, V.; Hanninen, K. P.; Leino, A.; Pulkki, K.; Peltola, O.; Nanto, V.; Voipio-Pulkki, L. M.; Irjala, K. (1994):**  
Generation of reference values for cardiac enzymes from hospital admission laboratory data.  
Eur J Clin Chem Clin Biochem. 32(10), 789-96.

**Katoh, N. (2002):**  
Relevance of apolipoproteins in the development of fatty liver and fatty liver-related peripartum diseases in dairy cows.  
J Vet Med Sci. 64(4), 293-307.

**Kelton, D. F.; Lissemore, K. D.; Martin, R. E. (1998):**  
Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle.  
J Dairy Sci. 81(9), 2502-9.

**Kessel, S.; Stroehl, M.; Meyer, H. H.; Hiss, S.; Sauerwein, H.; Schwarz, F. J.; Bruckmaier, R. M. (2008):**  
Individual variability in physiological adaptation to metabolic stress during early lactation in dairy cows kept under equal conditions.  
J Anim Sci. 86(11), 2903-12.

**Keunen, J. E.; Plaizier, J. C.; Kyriazakis, L.; Duffield, T. F.; Widowski, T. M.; Lindinger, M. I.; McBride, B. W. (2002):**

Effects of a subacute ruminal acidosis model on the diet selection of dairy cows.

J Dairy Sci. 85(12), 3304-13.

**Kräft, S. (2004):**

Charakterisierung der peripheren Insulin-Response und Insulin-Sensitivität bei trockenstehenden, laktierenden und leberverfetteten Milchkühen ohne und mit Ketose mittels hyperinsulinämischer, euglycämischer Clamps.

Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.

**Kraft, W.; Dürr, U. (2005):**

Allgemeine Labortechnik

In: W. Kraft und U. Dürr (Hrsg.); Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.

Schattauer-Verlag; Stuttgart und New York, 5. Auflage, S. 15 - 27.

**Krebs, H. A. (1966):**

Bovine ketosis.

Vet Rec. 78(6), 187-92.

**Kronfeld, D. S.; Raggi, F.; Ramberg, C. F., Jr. (1968):**

Mammary blood flow and ketone body metabolism in normal, fasted, and ketotic cows.

Am J Physiol. 215(1), 218-27.

**Lacetera, N.; Scalia, D.; Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Pirazzi, D.; Nardone, A. (2005):**

Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition.

J Dairy Sci. 88(6), 2010-6.

**Lacetera, N.; Scalia, D.; Franci, O.; Bernabucci, U.; Ronchi, B.; Nardone, A. (2004):**

Short communication: effects of nonesterified fatty acids on lymphocyte function in dairy heifers.

J Dairy Sci. 87(4), 1012-4.

**LeBlanc, S. J. (2006):**

Monitoring Programs For Transition Dairy Cows.

World Buiatric Congress, Nizza, Italien, S. 460-472.

**LeBlanc, S. J.; Leslie, K. E.; Duffield, T. F. (2005):**

Metabolic predictors of displaced abomasum in dairy cattle.

J Dairy Sci. 88(1), 159-70.

**Lehwenich, T. (1999):**

Untersuchungen zur Durchführung der Stoffwechselüberwachung in der Bestandsbetreuung von Milchviehherden.

Dissertation, Freie-Universität Berlin.

**Leroy, J. L.; Opsomer, G.; De Vlieghe, S.; Vanholder, T.; Goossens, L.; Geldhof, A.; Bols, P. E.; de Kruif, A.; Van Soom, A. (2005a):**

Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows.

Therio. 64(9), 2022-36.

**Leroy, J. L.; Vanholder, T.; Delanghe, J. R.; Opsomer, G.; Van Soom, A.; Bols, P. E.; Dewulf, J.; de Kruif, A. (2004):**

Metabolic changes in follicular fluid of the dominant follicle in high-yielding dairy cows early post partum. Therio. 62(6), 1131-43.

**Leroy, J. L.; Vanholder, T.; Mateusen, B.; Christophe, A.; Opsomer, G.; de Kruif, A.; Genicot, G.; Van Soom, A. (2005b):**

Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro.

Repro. 130(4), 485-95.

**Leroy, J. L.; Vanholder, T.; Opsomer, G.; Van Soom, A.; Bols, P. E. J.; Bossaert, P.; deKruif, A. (2006):**  
Typical Metabolic Changes in High Producing Dairy Cows early postpartum and their Consequences on Oocyte Quality.

Vlaams Diergebeeskundig Tijdschrift. 75, 95 - 105.

**Leslie, K. D., T.; LeBlanc, S. (2002):**

Monitoring and Managing Energy Balance in the Transition Dairy Cow.

abgerufen am 23.06.2009, unter <http://www.cvm.umn.edu/img/assets/9090/leslie%20proc.pdf>.

**Lingaas, F.; Tveit, B. (1992):**

Etiology of acetonemia in Norwegian cattle. 2. Effect of butyric acid, valeric acid, and putrescine.

J Dairy Sci. 75(9), 2433-9.

**Lopez, H.; Satter, L. D.; Wiltbank, M. C. (2004):**

Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows.

Anim Reprod Sci. 81(3-4), 209-23.

**Lorenz, R. J. (1992):**

Grundbegriffe der Biometrie.

Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena.

**Lucy, M. C. (2001):**

Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end?

J Dairy Sci. 84(6), 1277-93.

**MacDonald, R. C.; MacDonald, R. I. (1988):**

Membrane surface pressure can account for differential activities of membrane-penetrating molecules.

J Biol Chem. 263(21), 10052-5.

**Maedler, K.; Spinass, G. A.; Dyntar, D.; Moritz, W.; Kaiser, N.; Donath, M. Y. (2001):**

Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function.

Diabetes. 50(1), 69-76.

**Martin, H. F.; Hologgitas, J. V.; Driscoll, J.; Fanger, H. (1981):**

Reference values based on populations accessible to hospitals

In: R. Gräsbeck und T. Alström (Hrsg.); Reference Values in Laboratory Medicine.

Wiley; Chichester, 233-262.

**Martin, S. (1984):**

Estimating disease prevalence and the interpretation of test results.  
Prev Vet Med. 2, 463 - 472.

**Mason, T. M.; Goh, T.; Tchipashvili, V.; Sandhu, H.; Gupta, N.; Lewis, G. F.; Giacca, A. (1999):**

Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats.  
Diabetes. 48(3), 524-30.

**McGann, A. M.; Hodson, A. W. (1991):**

Delay in cell separation, storage and anticoagulants induced inaccuracies in measuring plasma non-esterified fatty acids.

Clin Chim Acta. 197(3), 265-70.

**Menendez, L. G.; Fernandez, A. L.; Enguix, A.; Ciriza, C.; Amador, J. (2001):**

Effect of storage of plasma and serum on enzymatic determination of non-esterified fatty acids.

Ann Clin Biochem. 38(Pt 3), 252-5.

**Miller, P. S.; Reis, B. L.; Calvert, C. C.; DePeters, E. J.; Baldwin, R. L. (1991):**

Patterns of nutrient uptake by the mammary glands of lactating dairy cows.

J Dairy Sci. 74(11), 3791-9.

**Morris, J. D.; Fernandez, J. M.; Chapa, A. M.; Gentry, L. R.; Thorn, K. E.; Weick, T. M. (2002):**

Effects of sample handling, processing, storage and hemolysis on measurements of key energy metabolites in ovine blood.

Small Rumin. Res. 43, 157 - 166.

**Moyes, K. M.; Larsen, T.; Friggens, N. C.; Drackley, J. K.; Ingvarsen, K. L. (2009):**

Identification of potential markers in blood for the development of subclinical and clinical mastitis in dairy cattle at parturition and during early lactation.

J Dairy Sci. 92(11), 5419-28.

**Mu, Y. M.; Yanase, T.; Nishi, Y.; Tanaka, A.; Saito, M.; Jin, C. H.; Mukasa, C.; Okabe, T.; Nomura, M.; Goto, K.; Nawata, H. (2001):**

Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells.

Endocrinology. 142(8), 3590-7.

**Mulligan, F. J.; O'Grady, L.; Rice, D. A.; Doherty, M. L. (2006):**

A herd health approach to dairy cow nutrition and production diseases of the transition cow.

Anim Reprod Sci. 96(3-4), 331-53.

**Murondoti, A.; Jorritsma, R.; Beynen, A. C.; Wensing, T.; Geelen, M. J. (2004):**

Activities of the enzymes of hepatic gluconeogenesis in periparturient dairy cows with induced fatty liver.

J Dairy Res. 71(2), 129-34.

**Naus, A. J.; Borst, A.; Kuppens, P. S. (1982):**

Determination of n-dimensional reference ellipsoids using patient data.

J Clin Chem Clin Biochem. 20(2), 75-80.

**Nielsen, N. I.; Ingvarstsen, K. L.; Larsen, T. (2003):**

Diurnal variation and the effect of feed restriction on plasma and milk metabolites in TMR-fed dairy cows. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 50(2), 88-97.

**Nikkhah, A.; Furedi, C. J.; Kennedy, A. D.; Crow, G. H.; Plaizier, J. C. (2008):**

Effects of feed delivery time on feed intake, milk production, and blood metabolites of dairy cows. J Dairy Sci. 91(11), 4249-60.

**Nyman, A. K.; Emanuelson, U.; Holtenius, K.; Ingvarstsen, K. L.; Larsen, T.; Waller, K. P. (2008):**

Metabolites and immune variables associated with somatic cell counts of primiparous dairy cows. J Dairy Sci. 91(8), 2996-3009.

**Odensten, M. O.; Chilliard, Y.; Holtenius, K. (2005):**

Effects of two different feeding strategies during dry-off on metabolism in high-yielding dairy cows. J Dairy Sci. 88(6), 2072-82.

**Oetzel, G. R. (2004):**

Monitoring and testing dairy herds for metabolic disease. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 20(3), 651-74.

**Oetzel, G. R. (2007):**

Herd-Level Ketosis - Diagnosis and Risk Factors. American Association of Bovine Practitioners, 40th Annual Conference, Vancouver, BC, Canada.

**Oikawa, S.; Oetzel, G. R. (2006):**

Decreased insulin response in dairy cows following a four-day fast to induce hepatic lipidosis. J Dairy Sci. 89(8), 2999-3005.

**Osborne, T. M. (2003):**

An evaluation of metabolic function in transition dairy cows supplemented with Rumensin premix or administered a Rumensin controlled-release capsule. MSc Dissertation, University of Guelph.

**Ospina, P. A.; Nydam, D. V.; Stokol, T.; Overton, T. R. (2010a):**

Associations of elevated nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations with early lactation reproductive performance and milk production in transition dairy cattle in the northeastern United States. J Dairy Sci. 93(4), 1596-603.

**Ospina, P. A.; Nydam, D. V.; Stokol, T.; Overton, T. R. (2010b):**

Evaluation of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate in transition dairy cattle in the northeastern United States: Critical thresholds for prediction of clinical diseases. J Dairy Sci. 93(2), 546-54.

**Overton, T. R. (2001):**

Transition Cow Programs - The Good, The Bad, and How to keep them from Getting Ugly. Adv Dairy Tech. 13, 13-26.

**Overton, T. R.; Drackley, J. K.; Ottemann-Abbamonte, C. J.; Beaulieu, A. D.; Emmert, L. S.; Clark, J. H. (1999):**

Substrate utilization for hepatic gluconeogenesis is altered by increased glucose demand in ruminants.  
J Anim Sci. 77(7), 1940-51.

**Pires, J. A.; Souza, A. H.; Grummer, R. R. (2007):**

Induction of hyperlipidemia by intravenous infusion of tallow emulsion causes insulin resistance in Holstein cows.  
J Dairy Sci. 90(6), 2735-44.

**Plaizier, J. C.; Fairfield, A. M.; Azevedo, P. A.; Nikkiah, A.; Duffield, T. F.; Crow, G. H.; Bagg, R.; Dick, P.; McBride, B. W. (2005):**

Effects of monensin and stage of lactation on variation of blood metabolites within twenty-four hours in dairy cows.  
J Dairy Sci. 88(10), 3595-602.

**Pullen, D. L.; Liesman, J. S.; Emery, R. S. (1990):**

A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media.  
J Anim Sci. 68(5), 1395-9.

**Quiroz-Rocha, G. F.; LeBlanc, S. J.; Duffield, T. F.; Jefferson, B.; Wood, D.; Leslie, K. E.; Jacobs, R. M. (2010):**

Short communication: Effect of sampling time relative to the first daily feeding on interpretation of serum fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in dairy cattle.  
J Dairy Sci. 93(5), 2030-3.

**Quiroz-Rocha, G. F.; LeBlanc, S. J.; Duffield, T. F.; Wood, D.; Leslie, K. E.; Jacobs, R. M. (2009):**

Reference limits for biochemical and hematological analytes of dairy cows one week before and one week after parturition.  
Can Vet J. 50(4), 383-8.

**Radostits, O. (2000):**

Fatty Liver in Cattle

In: O. Radostits, C. Gay, D. Blood und K. Hinchcliff (Hrsg.); Veterinary Medicine, A Textbook of the Diseases of Cattle, Sheep, Pigs, Goats and Horses.

W. B. Saunders; London, 9. Ausgabe, S. 1462ff.

**Redetzky, R.; Hamann, J.; Krömker, V. (2003):**

Zum Einfluss des Blutentnahmortes auf Parameter des Blutprofils bei hochleistenden Kühen.  
Tierärztl P. 31, 308-313.

**Rehage, J.; Mertens, M.; Stockhofe-Zurwieden, N.; Kaske, M.; Scholz, H. (1996):**

Post surgical convalescence of dairy cows with left abomasal displacement in relation to fatty liver.  
Schweiz Arch Tierheilkd. 138(7), 361-8.

**Reid, I. M. (1980):**

Incidence and severity of fatty liver in dairy cows.  
Vet Rec. 107(12), 281-4.

**Reist, M.; Erdin, D.; von Euw, D.; Tschuemperlin, K.; Leuenberger, H.; Chilliard, Y.; Hammon, H. M.; Morel, C.; Philipona, C.; Zbinden, Y.; Kuenzi, N.; Blum, J. W. (2002):**

Estimation of energy balance at the individual and herd level using blood and milk traits in high-yielding dairy cows.

J Dairy Sci. 85(12), 3314-27.

**Roemer, S. H. H. (2005):**

Anwendung der Leberbiopsie und der Leberfettbestimmung in der Gesundheitsüberwachung von Milchviehherden.

Dissertation, Freie Universität Berlin.

**Rogiers, V. (1978):**

Stability of the long chain non-esterified fatty acid pattern in plasma and blood during different storage conditions.

Clin Chim Acta. 84(1-2), 49-54.

**Rossow, N. (2003):**

"Fettmobilisationssyndrom der Milchkuh."

abgerufen am 20.05.2009, unter: [http://www.portal-rind.de/portal/data/artikel/45/artikel\\_45.pdf](http://www.portal-rind.de/portal/data/artikel/45/artikel_45.pdf).

**Rossow, N.; Jacobi, U.; Schäfer, M.; Lippmann, R.; Furcht, G.; Slanina, L.; Vrzgula, L.; Ehrentraut, W. (1987):**

Stoffwechselüberwachung bei Haustieren - Probleme, Hinweise und Referenzwerte  
Sonderheft 61

Tierhygiene Information, Eberswalde-Finow.

**Royal, M.; Mann, G. E.; Flint, A. P. (2000):**

Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle.

Vet J. 160(1), 53-60.

**Rukkamsuk, T.; Wensing, T.; Geelen, M. J. (1998):**

Effect of overfeeding during the dry period on regulation of adipose tissue metabolism in dairy cows during the periparturient period.

J Dairy Sci. 81(11), 2904-11.

**Russell, K. E.; Roussel, A. J. (2007):**

Evaluation of the ruminant serum chemistry profile.

Vet Clin North Am Food Anim Pract. 23(3), 403-26, v.

**Scalia, D.; Lacetera, N.; Bernabucci, U.; Demeyere, K.; Duchateau, L.; Burvenich, C. (2006):**

In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability.

J Dairy Sci. 89(1), 147-54.

**Schröder, U.; Staufenbiel, R. (2006a):**

Anwendung der Bestimmung der Konzentration an Freien Fettsäuren im Blutserum (NEFA) in der Rinderpraxis.  
6. Berlin-Brandenburgischer Rindertag, Berlin, Deutschland, S. 157-160.



**Schröder, U. J.; Staufenbiel, R. (2006b):**

Invited review: Methods to determine body fat reserves in the dairy cow with special regard to ultrasonographic measurement of backfat thickness.

J Dairy Sci. 89(1), 1-14.

**Schulze, B. (2008):**

Ex vivo-Veränderungen von Parametern des Stoffwechselprofils im Rinderblut - Ein Beitrag zur Entwicklung von Qualitätsstandards für die Blutentnahme beim Rind.

Dissertation, Freie Universität Berlin.

**Shimabukuro, M.; Zhou, Y. T.; Levi, M.; Unger, R. H. (1998):**

Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes.

Proc Natl Acad Sci U S A. 95(5), 2498-502.

**Solberg, H. E.; Grasbeck, R. (1989):**

Reference values.

Adv Clin Chem. 27, 1-79.

**Spohr, M.; Behning, J.; Scholz, H. (1992):**

Informationen aus der Milch des Rindes zur Überprüfung von Fütterung und Gesundheit.

Collegium Veterinarium XXIII, 52 - 56.

**Staufenbiel, R. (1999):**

Stoffwechselüberwachung der Milchkuhherde als Mittel zur Stabilisierung von Leistung und Gesundheit.

3. Symposium zu Fragen der Fütterung und des Managements von Hochleistungskühen, Neuruppin, Deutschland.

**Staufenbiel, R.; Johannsen, U.; Dargel, D.; Rossow, N. (1992):**

Experimental investigations about fatty liver of dairy cows after feed restriction.

Monatsh Vetmed. 47, 559-566.

**Staufenbiel, R.; Lügner, D.; Lügner, E.; Rossow, N. (1990):**

Zur Beurteilung des Leberfettgehaltes bei der Milchkuh.

Monatsh Vetmed. 45, 532 - 537.

**Staufenbiel, R. B., S.; Wolf, J.; Rossow, N. (1989):**

Eignung der Untersuchungsgrößen des Energie- und Fettstoffwechsels zur Einzeltiercharakterisierung von Milchkuhen.

Monatsh Vetmed. 44, 637- 643.

**Staufenbiel, R. L., D.; Lügner, E.; Rossow, N. (1990):**

Zur Beurteilung des Leberfettgehaltes bei der Milchkuh.

Monatsh Vetmed. 45, 532 - 537.

**Stöber, M.; Scholz, H. (1991):**

Treatment of dairy cow for lipomobilisation syndrome.

Monatsh Vetmed. 56, 563-566.

**Stokol, T.; Nydam, D. V. (2005):**

Effect of anticoagulant and storage conditions on bovine nonesterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in blood.

J Dairy Sci. 88(9), 3139-44.

**Stokol, T.; Nydam, D. V. (2006):**

Effect of hemolysis on nonesterified fatty acid and beta-hydroxybutyrate concentrations in bovine blood.

J Vet Diagn Invest. 18(5), 466-9.

**Strang, B. D.; Bertics, S. J.; Grummer, R. R.; Armentano, L. E. (1998):**

Effect of long-chain fatty acids on triglyceride accumulation, gluconeogenesis, and ureagenesis in bovine hepatocytes.

J Dairy Sci. 81(3), 728-39.

**Suriyasathaporn, W.; Heuer, C.; Noordhuizen-Stassen, E. N.; Schukken, Y. H. (2000):**

Hyperketonemia and the impairment of udder defense: a review.

Vet Res. 31(4), 397-412.

**Sutton, J. D.; Hart, I. C.; Morant, S. V.; Schuller, E.; Simmonds, A. D. (1988):**

Feeding frequency for lactating cows: diurnal patterns of hormones and metabolites in peripheral blood in relation to milk-fat concentration.

Br J Nutr. 60(2), 265-74.

**Swets, J. A. (1988):**

Measuring the accuracy of diagnostic systems.

Science. 240(4857), 1285-93.

**Theilgaard, P.; Friggens, N. C.; Sloth, K.; Ingvarstsen, K. L. (2002):**

The effect of breed, parity and body fatness on the lipolytic response of dairy cows.

Anim Sci. 75, 209-219.

**Tveit, B.; Lingaas, F.; Svendsen, M.; Sjaastad, O. V. (1992):**

Etiology of acetonemia in Norwegian cattle. 1. Effect of ketogenic silage, season, energy level, and genetic factors.

J Dairy Sci. 75(9), 2421-32.

**Van Saun, R. J. (2004):**

Metabolic profiling and health risk in transition cows.

Proc Am Ass Bov Pract. 37, 212-213.

**van Saun, R. J. (2007a):**

Application of a pooled sample metabolic profile for use as a herd screening tool.

Proceedings Danske Kvægfygdylærgers Årsmøde (Danish Bovine Practitioner Seminar), Middelfart.

**Van Saun, R. J. (2007b):**

Metabolic profiling of transition cows: Can we predict an impending problem?

Proceedings Danske Kvægfygdylærgers Årsmøde (Danish Bovine Practitioner Seminar), Middelfart, Dänemark.

**Van Winden, S. C.; Jorritsma, R.; Muller, K. E.; Noordhuizen, J. P. (2003):**

Feed intake, milk yield, and metabolic parameters prior to left displaced abomasum in dairy cows.  
J Dairy Sci. 86(4), 1465-71.

**Vanholder, T.; Leroy, J. L.; Opsomer, G.; deKruif, A. (2006a):**

Interactions between Energy Balance and ovarian activity in high yielding dairy cows early postpartum: A Review.  
Vlaams Diergebeeskundig Tijdschrift. 75, 79 - 85.

**Vanholder, T.; Leroy, J. L.; Soom, A. V.; Opsomer, G.; Maes, D.; Coryn, M.; de Kruif, A. (2005):**

Effect of non-esterified fatty acids on bovine granulosa cell steroidogenesis and proliferation in vitro.  
Anim Reprod Sci. 87(1-2), 33-44.

**Vanholder, T.; Leroy, J. L.; Van Soom, A.; Maes, D.; Coryn, M.; Fiers, T.; de Kruif, A.; Opsomer, G. (2006b):**

Effect of non-esterified fatty acids on bovine theca cell steroidogenesis and proliferation in vitro.  
Anim Reprod Sci. 92(1-2), 51-63.

**Vap, L. M.; Weiser, M. G. (2007):**

Field chemistry analysis.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract. 23(3), 427-42, v-vi.

**Vazquez-Anon, M.; Bertics, S.; Luck, M.; Grummer, R. R.; Pinheiro, J. (1994):**

Peripartum liver triglyceride and plasma metabolites in dairy cows.  
J Dairy Sci. 77(6), 1521-8.

**Veenhuizen, J. J.; Drackley, J. K.; Richard, M. J.; Sanderson, T. P.; Miller, L. D.; Young, J. W. (1991):**

Metabolic changes in blood and liver during development and early treatment of experimental fatty liver and ketosis in cows.  
J Dairy Sci. 74(12), 4238-53.

**Vernon, R. G. (2005):**

Lipid metabolism during lactation: a review of adipose tissue-liver interactions and the development of fatty liver.  
J Dairy Res. 72(4), 460-9.

**Walsh, R. B.; Walton, J. S.; Kelton, D. F.; LeBlanc, S. J.; Leslie, K. E.; Duffield, T. F. (2007):**

The effect of subclinical ketosis in early lactation on reproductive performance of postpartum dairy cows.  
J Dairy Sci. 90(6), 2788-96.

**Wathes, D. C.; Fenwick, M.; Cheng, Z.; Bourne, N.; Llewellyn, S.; Morris, D. G.; Kenny, D.; Murphy, J.; Fitzpatrick, R. (2007):**

Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow.  
Therio. 68 Suppl 1, 232-41.

**Watson, T. D.; Tan, C. E.; McConnell, M.; Clegg, S. K.; Squires, L. F.; Packard, C. J. (1995):**

Measurement and physiological significance of lipoprotein and hepatic lipase activities in preheparin plasma.  
Clin Chem. 41(3), 405-12.

**Wensing, T.; Kruip, T. A.; Geelen, M. J.; Wentink, G. H.; van den Top, A. M. (1997):**

Postpartum fatty liver in high-producing dairy cows in practice and in animal studies. The connection with health, production and reproduction problems.

Comp Haematol Int. 7, 167-171.

**Whitaker, D. A. (1996):**

Interpretation of the metabolic profiles in dairy cows.

19th World Buiatric Congress, Edinburgh, Großbritannien.

**Willer, H. (1982):**

Praktische Stichprobenplanung.

Gustav Fischer Verlag - Jena.

**Wylie, A. R.; Woods, S.; Carson, A. F.; McCoy, M. (2008):**

Periprandial changes in metabolite and metabolic hormone concentrations in high-genetic-merit dairy heifers and their relationship to energy balance in early lactation.

J Dairy Sci. 91(2), 577-86.

**Zammit, V. A. (1990):**

Ketogenesis in the Liver of Ruminants - Adaptations to a challenge.

J Agric Sci. 115, 155-162.

**Zebeli, Q.; Tafaj, M.; Junck, B.; Olschlager, V.; Ametaj, B. N.; Drochner, W. (2008):**

Evaluation of the response of ruminal fermentation and activities of nonstarch polysaccharide-degrading enzymes to particle length of corn silage in dairy cows.

J Dairy Sci. 91(6), 2388-98.

**Zechner, G. (2009):**

Der Effekt einer 25(OH)D<sub>3</sub>-Supplementierung auf die Calciummobilisierungsfähigkeit bei Milchkühen zum Zeitpunkt der Geburt.

Dissertation, Freie Universität Berlin.

**Zerbe, H.; Schneider, N.; Leibold, W.; Wensing, T.; Kruip, T. A.; Schuberth, H. J. (2000):**

Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver.

Theriogenology. 54(5), 771-86.

**Zweig, M. H.; Campbell, G. (1993):**

Receiver-operating characteristic (ROC) plots: a fundamental evaluation tool in clinical medicine.

Clin Chem. 39(4), 561-77.

## 9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Definition der Transitperiode.....	3
Abbildung 2:	Schematischer NEFA-Stoffwechsel in der Leber.....	9
Abbildung 3:	NEFA-Konzentrationen im Serum und in der Follikelflüssigkeit von dominanten Follikeln.....	11
Abbildung 4:	Schematische Darstellung der Adaptation.....	16
Abbildung 5:	Tagesprofil der NEFA und der BHB im Serum von Milchkühen bei zweimaliger TMR-Fütterung um 10 und um 16 Uhr.....	19
Abbildung 6:	Durchschnittliche NEFA-Konzentration im Serum bei Milchkühen und Einteilung in niedrige (n = 741), mittlere (n = 435) und hohe (n = 380) NEFA-Gruppen.....	24
Abbildung 7:	Krankheitsinzidenz bei Milchkühen nach NEFA-Gruppen.....	24
Abbildung 8:	Einfluss der Futterrestriktion (65% der ad libitum TM-Aufnahme) auf die NEFA und die Glukose im Serum.....	29
Abbildung 9:	Einfluss der Futterrestriktion (65% der ad libitum TM-Aufnahme) auf die BHB im Serum und in der Milch.....	29
Abbildung 10:	Inzidenz der Subklinischen (SCK) und Klinischen Ketose (CK) in 25 Milchviehherden .....	30
Abbildung 11:	Schematische Darstellung zum Versuchsablauf Tagesdynamik für 10 Kühe aus der Vorbereitergruppe (A) und 10 Kühe aus der Früh lactation (B).....	37
Abbildung 12:	Schematische Darstellung zum Versuchsablauf der Dynamik der NEFA und der BHB in der Transitperiode.....	38
Abbildung 13:	Schematische Darstellung zur Herstellung der Poolproben und des Mittelwertes einer Stichprobe bei n = 10.....	39
Abbildung 14:	Schiefe einer Verteilungsfunktion.....	44
Abbildung 15:	Häufigkeitsverteilung der TN (true-negative), FN (false-negative), TP (true-positive) und FP (false-positive) in einer gesunden und kranken Population.....	46
Abbildung 16:	Beispiel einer ROC-Kurve.....	46
Abbildung 17:	Bland-Altman-Methodenvergleich für die NEFA zwischen dem Nullwert und der Tiefgefrierung (NEFA_TG) der Proben.....	48
Abbildung 18:	Bland-Altman-Methodenvergleich für die BHB zwischen dem Nullwert und der Tiefgefrierung (BHB_TG) der Proben.....	49
Abbildung 19:	Bland-Altman-Methodenvergleich für die NEFA zwischen den Serumproben (Nullwert) und den Heparinplasmaproben (NEFAhep).....	52
Abbildung 20:	Bland-Altman-Methodenvergleich für die NEFA zwischen den Blutproben aus der A./V. caudalis mediana (NEFA_Nullwert) und den Blutproben aus der V. epigastrica cranialis superficialis (NEFA_Euter).....	53

Abbildung 21: Bland-Altman-Methodenvergleich für die BHB zwischen den Blutproben aus der A./V. caudalis mediana (BHB_Nullwert) und den Blutproben aus der V. epigastrica cranialis superficialis (BHB_Euter).....	54
Abbildung 22: Tagesprofil der NEFA (Zeiteffekt n.s.) für 10 Kühe aus der Vorbereitergruppe (Futternvorlage um 11 Uhr).....	57
Abbildung 23: Tagesprofil der BHB (Zeiteffekt $p < 0,05$ ) für 10 Kühe aus der Vorbereitergruppe (Futternvorlage um 11 Uhr).....	58
Abbildung 24: Tagesprofil der NEFA (Zeiteffekt $p < 0,05$ ) für 10 Kühe aus der Frischmelkergruppe (Futternvorlage um 10:30 Uhr, Melkvorgang um 7:45 Uhr, 14:45 Uhr und 23:45 Uhr).....	60
Abbildung 25: Tagesprofil der BHB (Zeiteffekt $p < 0,05$ ) für 10 Kühe aus der Frischmelkergruppe (Futternvorlage um 10:30 Uhr, Melkvorgang um 7:45 Uhr, 14:45 Uhr und 23:45 Uhr).....	61
Abbildung 26: Boxplotdarstellung der NEFA im gesamten Versuchszeitraum.....	64
Abbildung 27: Boxplotdarstellung der BHB im gesamten Versuchszeitraum.....	65
Abbildung 28: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der NEFA.....	68
Abbildung 29: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der BHB.....	68
Abbildung 30: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der NEFA nach logarithmischer Transformation.....	69
Abbildung 31: Relative Häufigkeit (H) der Einzelbeobachtungen der BHB nach logarithmischer Transformation.....	69
Abbildung 32: Relative Häufigkeit (H) der Poolwerte der NEFA.....	71
Abbildung 33: Relative Häufigkeit (H) der Poolwerte der BHB.....	71
Abbildung 34: Lineare Regressionsanalyse zwischen den Mittel- und Poolwerten der NEFA und der BHB.....	73
Abbildung 35: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der NEFA mit der absoluten Differenz.....	74
Abbildung 36: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der NEFA mit der prozentualen Differenz.....	74
Abbildung 37: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der BHB mit der absoluten Differenz.....	75
Abbildung 38: Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der BHB mit der absoluten Differenz.....	75
Abbildung 39: Beziehung zwischen dem NEFA-Poolwert und der Anzahl an Tieren $>0,8$ mmol NEFA/l mit der entsprechenden Regressionsgeraden.....	76
Abbildung 40: Schiefe und Kurtosis der NEFA in Abhängigkeit vom maximalen Poolwert in der Population; Ausgangspopulation 110 Herden.....	81

---

Abbildung 41: Schiefe und Kurtosis der BHB in Abhängigkeit vom maximalen Poolwert in der Population; Ausgangspopulation 110 Herden.....	81
Abbildung 42: ROC-Kurvenanalyse des NEFA-Poolwertes; Verdächtig (1 bis 2 Tiere >0,6mmol/l) vs. Gestört ( $\geq 3$ Tiere >0,6mmol/l); AUC = 0,96; empfohlener Cutpoint = 0,49mmol/l.....	85
Abbildung 43: Prädiktive Werte (PreV+ positiver prädiktiver Wert; PreV- negativer prädiktier Wert) des Cutpoints der NEFA zur Trennung zwischen Verdächtig und Krank (0,8mmol/l; Se 84,6%; Sp 84,6%) in Abhängigkeit von der Prävalenz.....	87
Abbildung 44: Prädiktive Werte (PreV+ positiver prädiktiver Wert; PreV- negativer prädiktier Wert) des Cutpoints der BHB zur Trennung zwischen Verdächtig und Krank (1,2mmol/l; Se 90,6%; Sp 92,3%) in Abhängigkeit von der Prävalenz.....	88
Abbildung 45: Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels der Herde in der ersten Woche p.p. durch Streuungsmaße.....	110
Abbildung 46: Schematische Abbildung zur Einteilung der Herden für die ROC-Kurvenanalyse...	110
Abbildung 47: Beurteilung der Adaptation des Energiestoffwechsels der Herde in der ersten Woche p.p. durch zwei Referenzgrenzen der NEFA und der BHB.....	112

## 10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Wichtige biologische Prozesse und Stoffwechselalterationen beim Übergang zur Laktation.....	4
Tabelle 2:	Risikofaktoren für eine Leberverfettung bei Milchkühen.....	8
Tabelle 3:	Pathogenetische Wirkung der NEFA auf Zellen des Reproduktionstraktes des Rindes.....	13
Tabelle 4:	Pathogenetische Wirkung der NEFA auf $\beta$ -Zellen der Ratte.....	14
Tabelle 5:	Pathogenetische Wirkung der NEFA auf PMN und Lymphozyten des Rindes.....	15
Tabelle 6:	Fehlerquellen in der klinisch-chemischen Diagnostik.....	17
Tabelle 7:	Literaturangaben zur Stabilität der NEFA und der BHB bei Lagerung des Vollblutes, Plasmas bzw. Serums bei Raum- (RT) oder Kühlschrantemperatur (KT).....	20
Tabelle 8:	Literaturangaben zum Einfluss der Antikoagulantien Fluorid, Heparin, EDTA auf die Konzentration der NEFA und der BHB im Vergleich zum Serum.....	21
Tabelle 9:	Literaturangaben zur Stabilität der NEFA und der BHB bei Tiefgefrierung.....	22
Tabelle 10:	Übersicht zu NEFA-Grenzwerten im Serum/Plasma vor der Kalbung.....	23
Tabelle 11:	Übersicht zu Grenzwerten der NEFA und der BHB im Serum/Plasma bei Milchkühen in der Früh lactation.....	27
Tabelle 12:	Risikomaß, Sensitivität (Se) und Spezifität (Sp) für die NEFA und die BHB zur Vorhersage der Labmagenverlagerung, der klinischen Ketose und der Metritis in der Früh lactation.....	28
Tabelle 13:	Stichprobengröße bei 75% Konfidenz in Abhängigkeit von der geschätzten Prävalenz und der Populationsgröße.....	32
Tabelle 14:	Übersicht zu Grenzwerten der NEFA und der BHB im Serum/Plasma bei Milchkühen unter Anwendung als Stichprobentestverfahren und Beurteilung des Anteils an Tieren mit abnormen Werten innerhalb der Stichprobe.....	33
Tabelle 15:	Übersicht zu Grenzwerten der NEFA und der BHB im Serum/Plasma unter Anwendung als Stichprobentestverfahren und Beurteilung des Mittel- oder Poolwertes.....	34
Tabelle 16:	Versuchsablauf zum Einfluss präanalytischer Faktoren.....	36
Tabelle 17:	Übersicht der untersuchten Betriebe.....	38
Tabelle 18:	Präzision der Bestimmungsmethoden.....	40
Tabelle 19:	Materialien zur Untersuchung der präanalytischen Einflussfaktoren (1), der Tagesdynamik (2), der Dynamik in der Transitperiode (3) und der Poolproben (4)....	40
Tabelle 20:	Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Tiefgefrierung (-20°C) des Serums für 24h gegenüber dem Nullwert.....	47



Tabelle 21:	Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Lagerung des Serums bei Raumtemperatur (+20°C) für 12h und 24h gegenüber dem Nullwert.....	49
Tabelle 22:	Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Lagerung des Serums im Kühlschrank (+7°C) für 1,3,5 und 7d gegenüber dem Nullwert.....	50
Tabelle 23:	Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Verwendung von EDTA oder Heparin als Antikoagulanzen gegenüber dem Serum (Nullwert).....	51
Tabelle 24:	Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Blutentnahme aus der V. jugularis externa (Halsvene) oder der V. epigastrica cran. spf. (Eutervene) gegenüber der Arteria oder Vena caudalis mediana (Nullwert).....	53
Tabelle 25:	Mittlere Differenz und Übereinstimmungsgrenzen bei Lagerung von Vollblut ohne Antikoagulanzen, EDTA-Vollblut und Heparin-Vollblut für 24 Stunden bei Raum- oder Kühlschranktemperatur gegenüber dem Nullwert.....	55
Tabelle 26:	Deskriptive Statistik und Einfluss der varianzanalytischen Faktoren auf das Tagesprofil der NEFA (mmol/l) und der BHB (mmol/l) eine Woche ante partum....	56
Tabelle 27:	Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des NEFA-Tagesprofils bei Kühen aus der Vorbereitergruppe .....	56
Tabelle 28:	Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des BHB-Tagesprofils bei Kühen aus der Vorbereitergruppe.....	57
Tabelle 29:	Deskriptive Statistik und Einfluss der varianzanalytischen Faktoren auf das Tagesprofil der NEFA (mmol/l) und der BHB (mmol/l) in der Früh-laktation.....	58
Tabelle 30:	Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des NEFA-Tagesprofils bei 10 Kühen aus der Frischmelkergruppe.....	59
Tabelle 31:	Mittelwert und Standardabweichung der einzelnen Untersuchungszeitpunkte des BHB-Tagesprofils bei 10 Kühen aus der Frischmelkergruppe.....	60
Tabelle 32:	Deskriptive Statistik und Prüfung auf Normalverteilung für die NEFA (mmol/l) und die BHB (mmol/l) im Versuchszeitraum.....	62
Tabelle 33:	Deskriptive Statistik und Einfluss der varianzanalytischen Faktoren auf die Dynamik der NEFA und der BHB im gesamten (21-19d a.p. bis 10d p.p.), antepartalen (21-19d a.p. bis 3-1d a.p.) und postpartalen (6h bis 10d p.p.) Versuchszeitraum.....	63
Tabelle 34:	Mittlere Differenz der NEFA (mmol/l) durch paarweise Vergleiche der Messzeitpunkte im gesamten Versuchszeitraum.....	64
Tabelle 35:	Mittlere Differenz der BHB (mmol/l) durch paarweise Vergleiche der Messzeitpunkte im gesamten Versuchszeitraum.....	66
Tabelle 36:	Absolute und relative Häufigkeit der Proben je Pool.....	67
Tabelle 37:	Deskriptive Statistik der Einzelwerte der NEFA und der BHB .....	67

---

Tabelle 38:	Absoluter und relativer Anteil der Einzelmesswerte der NEFA und der BHB über einem Grenzwert.....	70
Tabelle 39:	Deskriptive Statistik der Mittel- und Poolwerte der NEFA und der BHB.....	70
Tabelle 40:	Prüfung der Einzel-, Mittel- und Poolwerte der NEFA und der BHB auf Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test.....	72
Tabelle 41:	Bland-Altman-Methodenvergleich zwischen Mittel- und Poolwert der NEFA und der BHB.....	73
Tabelle 42:	Lineare Regressionsanalyse der NEFA bei den entsprechenden Referenzwerten für das Einzeltier.....	76
Tabelle 43:	Lineare Regressionsanalyse der BHB bei den entsprechenden Referenzwerten für das Einzeltier.....	77
Tabelle 44:	Multiple Regressionsanalyse zum Einfluss des kleinsten (NEFAmin) und größten (NEFAMax) NEFA-Einzelwertes in der Stichprobe auf den NEFA-Poolwert der Stichprobe.....	78
Tabelle 45:	Multiple Regressionsanalyse zum Einfluss des kleinsten (BHBmin) und größten (BHBmax) BHB-Einzelwertes in der Stichprobe auf den BHB-Poolwert der Stichprobe.....	78
Tabelle 46:	Absoluter und relativer Anteil an Herden mit der entsprechenden Anzahl an Einzeltieren in der Stichprobe (n = 10) über unterschiedlichen Referenzwerten für das Einzeltier.....	79
Tabelle 47:	Zusammenhang zwischen den gestörten Herden (n=110) ausgedrückt als Odds Ratio.....	80
Tabelle 48:	Deskriptive Statistik, parametrische und nicht- parametrischen Streuungsmaße verschiedener Verteilungsfunktionen von gepoolten Serumproben der NEFA.....	83
Tabelle 49:	Deskriptive Statistik, parametrische und nicht- parametrischen Streuungsmaße verschiedener Verteilungsfunktionen von gepoolten Serumproben der BHB.....	84
Tabelle 50:	Cutpoints der NEFA-Poolwerte zur Trennung zwischen den Herden im Sinne der Definition mit den entsprechenden diagnostischen Eigenschaften.....	86
Tabelle 51:	Cutpoints der BHB-Poolwerte zur Trennung zwischen den Herden im Sinne der Definition mit den entsprechenden diagnostischen Eigenschaften.....	87
Tabelle 52:	Empfehlungen zur Minimierung präanalytischer Einflussfaktoren bei der Verwendung der NEFA und der BHB in der Stoffwechselüberwachung.....	92
Tabelle 53:	Einfluss eines Ausreißers auf den Mittelwert der Stichprobe bei abnehmender Stichprobengröße.....	97
Tabelle 54:	Gegenüberstellung der Referenzwerte aus der ROC-Kurvenanalyse und den parametrischen und nicht parametrischen Streuungsmaßen für die NEFA.....	111

Tabelle 55:	Gegenüberstellung der Referenzwerte aus der ROC-Kurvenanalyse und den parametrischen und nicht parametrischen Streuungsmaßen für die BHB.....	111
Tabelle 56:	Hinweise zur Interpretation der gepoolten Serumproben der NEFA und der BHB in der ersten Woche p.p.....	114

## 11. Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Staufenbiel für die Überlassung des Themas und seine jederzeit freundlich gewährte Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit. Sollte diese Arbeit das Verständnis um die Stoffwechseluntersuchungen in Milchviehherden voran bringen, so ist das zu einem großen Teil nur durch seine Unterstützung möglich gewesen.

Frau Waberowski danke ich für die Bestimmung der Laborparameter und die Beschaffung von Untersuchungsmaterialien. Frau Westphal danke ich für Durchführung der zahlreichen Stoffwechseluntersuchungen, ohne deren Ergebnisse ein wesentlicher Abschnitt dieser Arbeit nicht zustande gekommen wäre. In diesem Zusammenhang möchte ich mich bei allen Doktoranden und Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere der Freien Universität Berlin für die zahlreichen Anregungen und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Zechner und Herrn Prof. Dr. Martens vom Institut für Veterinär-Physiologie der Freien Universität Berlin für die Bereitstellung der Proben und die tolle Zusammenarbeit.

Frau Dr. Arndt und Frau Lüdecke danke ich für die Hilfe bei der statistischen Auswertung und die interessanten Gespräche vor dem Hintergrund von  $p < 0,05$  und Poolproben.

Den an den Untersuchungen beteiligten Milchviehbetrieben bin ich für die hilfreiche Unterstützung zu Dank verpflichtet.

Ein großes Dankeschön gebührt den Kollegen Arne Jessen und Onno Burfeind für die großartige Unterstützung bei der Durchführung der Tagesprofile unter äußerst widrigen Witterungsbedingungen. Neben der Unterstützung bei der Dissertation verbinde ich auch zahlreiche positive Erinnerungen aus dem Studium mit diesen beiden erstklassigen „jagdlich Interessierten“.

Abschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meiner Freundin Merlind für die geleistete Unterstützung und die Geduld bedanken.

## **12. Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 28.10.2010

Stefan Borchardt