

### **3. MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1. Allgemeines**

Die Untersuchungen fanden zwischen Februar 2003 und Februar 2004 im Rahmen eines Projektes zur Etablierung neuerer diagnostischer Methoden in der Bestandsbetreuung auf sechs Milchviehbetrieben in Sachsen und einem Betrieb in Thüringen statt.

Die Betriebsgröße lag zwischen 380 bis 1100 Tieren pro Betrieb. Insgesamt repräsentierten die untersuchten Kühe einen Bestand von 4100 Tieren. Die jährliche Milchleistung lag im Mittel zwischen 8200 bis 10900 kg. Bei den untersuchten Tieren handelte es sich um Tiere der Rasse „Deutsche Schwarzbunte“.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Boxenlaufställen auf Spaltenböden bzw. Einstreu oder einstreulos mit Kalk. Die Kühe wurden ganzjährig im Stall gehalten. Die Abkalbbereiche waren eingestreut. Die Tiere liefen entweder in einer großen Gruppe, standen zu zwei bis fünf Tieren in Boxen oder wurden einzeln gehalten. Das Futter bestand aus einer totalen Mischration oder einer Mischration mit individueller Kraftfuttergabe über eine Abruffütterung.

Sechs der Betriebe wurden im monatlichen Abstand untersucht, Betrieb 2 wöchentlich.

#### **3.2. Auswahl der Probanden**

Für die Untersuchung wurden nur Tiere herangezogen, die bereits einmal in ihrem Leben abgekalbt hatten. Sie mussten den gleichen Haltungs- und Fütterungsbedingungen unterliegen wie der Herdenanteil, den sie repräsentieren sollten. Die Milchleistung der Probanden entsprach dem Herdenmittel. Die zu untersuchenden Tiere wurden pro Betrieb in zwei Gruppen, abhängig vom Laktationsstadium, unterteilt.

- Gruppe 1: Kühe 0-1 Woche post partum
- Gruppe 2: Kühe 3-5 Wochen post partum

Aus diesen beiden Gruppen wurden jeweils, soweit in der Anzahl vorhanden, 10 Tiere zufällig ausgewählt und beprobt. Eine Ausnahme stellt Betrieb 2 dar. Dort wurden neben den monatlichen Proben auch wöchentlich zehn Tiere der Gruppe 1 beprobt. Tiere der ersten Laktation wurden auf diesem Betrieb mit in die Untersuchungen einbezogen.

### 3.3. Probenentnahme

Das Probenmaterial bestand aus Blut und Lebergewebe. Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der Arteria oder Vena caudalis mediana. Das Blut wurde im 10-ml-Röhrchen ohne Antikoagulanzen zur Serumgewinnung aufgefangen.

Das Lebergewebe wurde mittels einer Leberbiopsienadel („Berliner Modell“, Eickemeyer® Medizintechnik für Tierärzte, Tuttlingen, Deutschland; siehe Abb. 1) nach der Methode von GRÖHN u. LINDBERG (1982) entnommen. Der Trokar ist 27cm lang, seine Hohlneedle hat einen Durchmesser von 2,5mm.

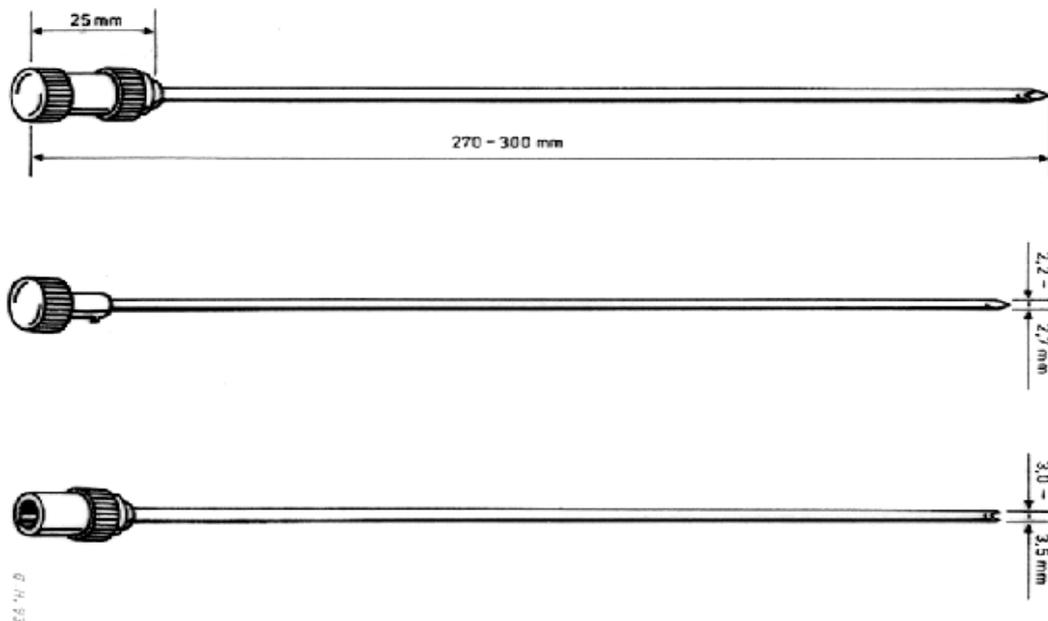
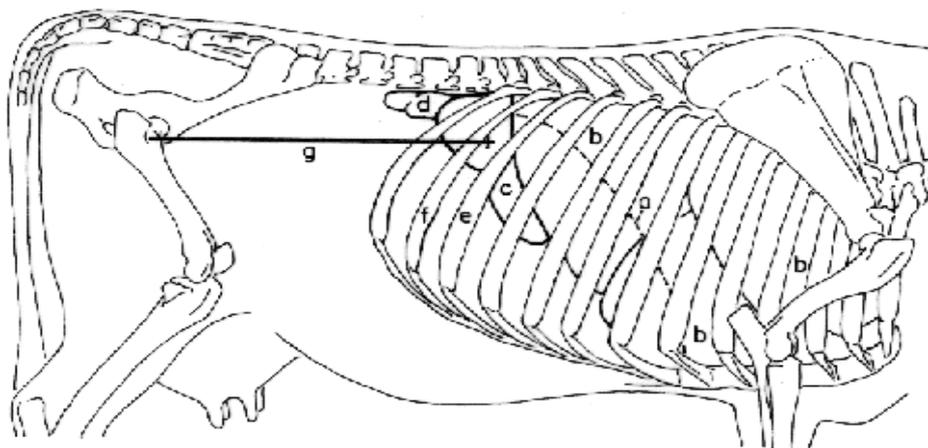


Abb. 1: Leberbiopsienadel „Berliner Modell“

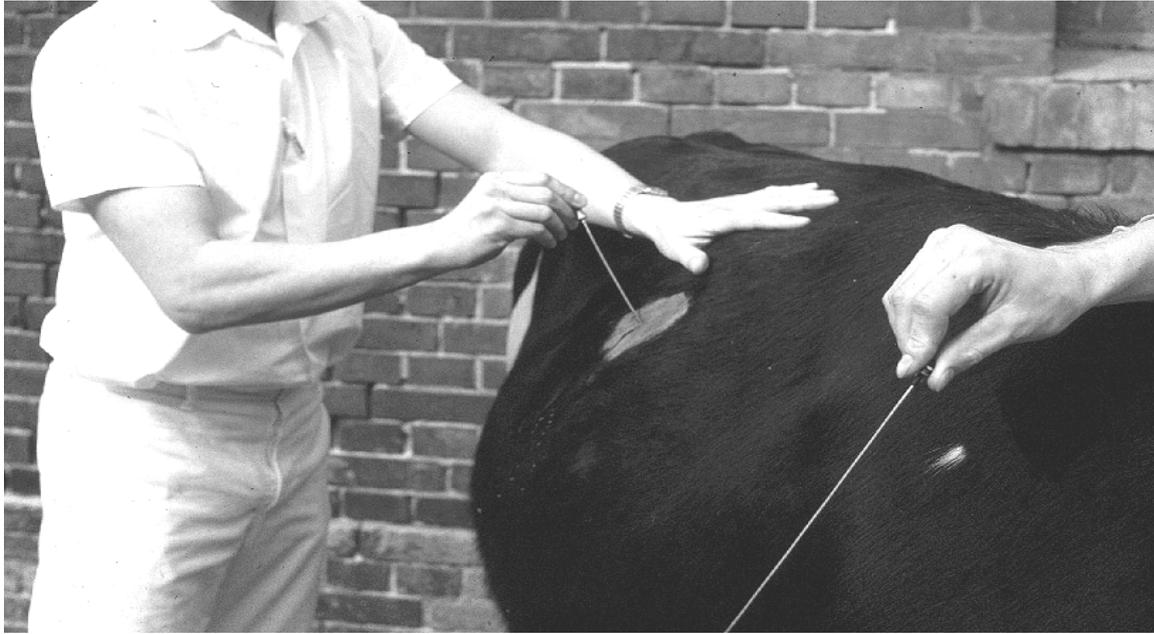
Die Leberbiopsie wurde auf der rechten Seite, eine Hand breit unterhalb einer gedachten Linie durch das Tuberculum coxae im 11. Intercostalraum durchgeführt (Abb. 2). An der Entnahmestelle wurde ein 3cm x 5cm Bereich rasiert, mit Alkohol entfettet und mit einer Jodlösung desinfiziert.

Anschließend wurde die Haut mit dem Histofreezer® (Braun) zur oberflächlichen Schmerzausschaltung vereist. Vor der eigentlichen Entnahme des Lebergewebes ist die Haut mit einem Skalpellstich über 1cm hinweg durchtrennt worden. Der Trokar wurde zunächst ruckartig senkrecht zur Körperoberfläche bis zur Hälfte in das Abdomen eingeführt und im Anschluss die Nadel in Richtung des gegenüberliegenden Ellenbogens vorgeschoben (Abb. 3). Sobald sich die Nadel in der Leber befand, wurde der Trokar herausgezogen und die Hohlnadel nun ca. 6mal schnell vor und zurückgeschoben. Beim Zurückziehen musste ein Finger auf die Öffnung der Nadel gesetzt werden, um so das Lebergewebe in der Hohlnadel zu behalten. Bei diesem Vorgehen konnten ungefähr 450mg Lebergewebe gewonnen werden. Die Wunde wurde mit Alu-Spray® (Selectavet) versorgt.



- + Ort der Leberbiopsie
- a) Profil der Zwerchfellkuppel
- b) Pulmo dexter
- a) Hepar
- d) Ren dexter
- e) 11. Rippe
- f) 12. Rippe
- g) Orientierungslinie

**Abb. 2: Entnahmestelle für die Leberbiopsie**



**Abb. 3: Technik der Leberbiopsie**

### **3.4. Probenaufbereitung**

Das Lebergewebe wurde unmittelbar nach der Entnahme mit einer Pinzette grob von Blut befreit. Lebergewebe, das nicht für den Kupfersulfattest benötigt wurde, ist eingefroren worden. Die Blutproben sind 4-6 Stunden nach ihrer Gewinnung für 10 Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert worden. Das so gewonnene Serum ist ebenfalls in der Klinik bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zum Zeitpunkt weiterer Untersuchungen eingefroren worden.

### **3.5. Bestimmung des Leberfettgehaltes**

Der Leberfettgehalt wurde zunächst direkt vor Ort mittels des Leberschwimmtestes nach HERDT (1983) bestimmt. Im Labor wurde der Leberfettgehalt erneut durch ein gravimetrisches Verfahren nach AHMED (2004) bestimmt.

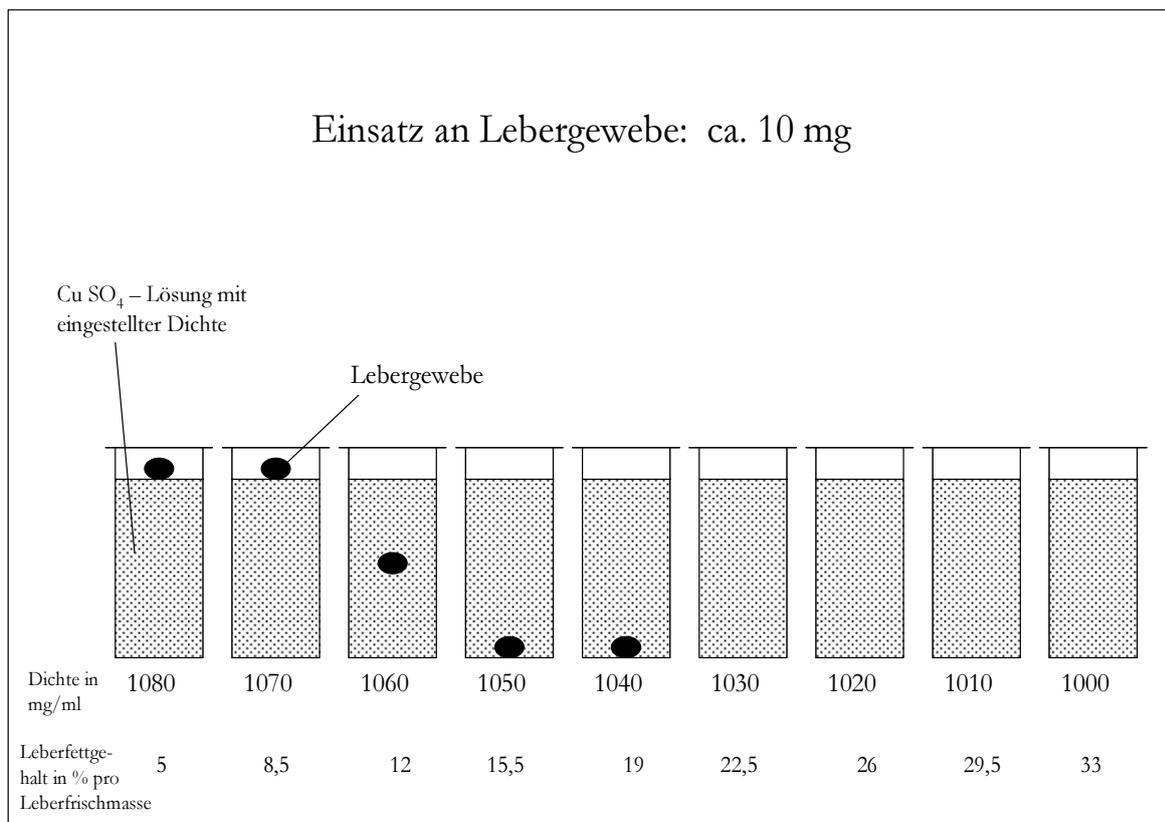
#### **3.5.1. Kupfersulfattest nach HERDT (1983)**

Der Test beruht auf dem Auftrieb des Lebergewebes in Kupfersulfatlösungen unterschiedlicher Dichte. Die Kupfersulfatlösungen wurden aus hydriertem Kupfersulfat und destilliertem, deionisiertem Wasser hergestellt. Zunächst ist eine Stammlösung hergestellt worden, aus der nun durch Zugabe des destillierten Wassers Lösungen mit absteigender Dichte hergestellt werden

konnten. Die spezifische Dichte der Lösungen wurde in Abständen von Zehnerschritten bei 1100 bis 1000 eingestellt.

Die Lösungen wurden in kleinen 5ml Reagenzröhrchen aus Kunststoff der Firma Sarstedt® aufbewahrt. Einmal im Monat oder nach jeweils 130 Proben sowie auch bei starker Verunreinigung sind die Lösungen erneuert worden. Jede spezifische Dichte entspricht einem spezifischen Leberfettgehalt in Prozent. In ein Röhrchen wurde destilliertes Wasser gegeben, was einem Leberfettgehalt von über 33% entspricht.

Ein kleines Stück Lebergewebe (ca. 10mg) wurde zunächst in die Lösung mit der höchsten Dichte gegeben und der Auftrieb bzw. die Schwimmfähigkeit beobachtet. Schwamm das Stück an der Oberfläche der Lösung, wurde es herausgenommen und in die Lösung der nächst niedrigeren Dichte überführt. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis das Stück Lebergewebe in einer der Lösungen zu Boden sank (Abb. 4). Der spezifische Leberfettgehalt ist anhand der Tab. 8 bestimmt worden.



**Abb. 4: CuSO<sub>4</sub>-Schwimmtest nach HERDT**

**Tab. 8: Beziehung zwischen spezifischer Dichte und Leberfettgehalt**

Spezifische Dichte		Fettgehalt	Spezifische Dichte		Fettgehalt
mg/ml		%	mg/ml		%
1000	Schwimmt	>33	1060	Schwimmt	12
	Sinkt	33 → 29,5		Sinkt	12 → 8,5
1010	Schwimmt	29,5	1070	Schwimmt	8,5
	Sinkt	29,5 → 26		Sinkt	8,5 → 5
1020	Schwimmt	26	1080	Schwimmt	5
	Sinkt	26 → 22,5		Sinkt	5 → 1,5
1030	Schwimmt	22,5	1090	Schwimmt	>1,5
	Sinkt	22,5 → 19		Sinkt	>1,5 → <1,5
1040	Schwimmt	19	1100	Schwimmt	<1,5
	Sinkt	19 → 15,5		Sinkt	<1,5 → 0
1050	Schwimmt	15,5			
	Sinkt	15,5 → 12			

### 3.5.2. Gravimetrische Bestimmung (AHMED 2004)

Für die gravimetrische Bestimmung des Leberfettgehaltes wurden zunächst die zehn Leberproben einer Untersuchungsgruppe gepoolt. Dazu wurden 10mg jeder Probe abgewogen, so dass ein Pool von 100mg Lebergewebe von jeder Gruppe vorlag. Die Poolprobe wurde nun zusammen mit 1ml tissue lysis buffer (Qiagen GmbH, Deutschland) in einen Glashomogenisator gegeben und mit einem Stößel ausreichend homogenisiert. Die homogenisierte Probe verblieb in einem abgedeckten Reagenzglas über Nacht in einem auf 55 °C temperierten Wasserbad.

Das Fett wurde mit Hilfe eines Chloroform-Methanol-Wasser Systems, wie von VEENHUIZEN et al. (1991) beschrieben, extrahiert. Die Chloroform-Methanol Mischung bestand aus zwei Teilen Chloroform (Merck®) und einem Teil Methanol (Merck®) (2vol : 1vol).

Drei Milliliter dieser Mischung wurden am nächsten Tag zur Probe hinzu gegeben, mit dieser kräftig vermischt und für 30 Minuten im Kühlschrank belassen. Anschließend wurde die Probe für 10 Minuten bei 5000 U/min zentrifugiert, so dass sich zwei Schichten im Reagenzglas bildeten. Die obere Schicht war das Methanol und die untere das Chloroform mitsamt dem Fett.

Die Chloroformschicht wurde mit Hilfe einer Cerbrospinalkanüle aufgezogen und in kleine Verdampfungsglasschälchen mit bekanntem Gewicht verbracht. Die Schälchen wurden auf eine Heizplatte (50°C) unter einen Abzug gestellt, damit das Chloroform verdunstet.

Der Rest der Probe wurde zweimal mit jeweils 1ml reinem Chloroform gewaschen, erneut zentrifugiert und die Prozedur bis zum Verdunsten des Chloroforms wiederholt.

Das in der Verdampfungsschale zurückbleibende Fett wurde gewogen und sein Anteil am Lebergewebe rechnerisch bestimmt.

### 3.6. Bestimmung der Serumparameter

Alle Serumparameter wurden im klinikeigenen Labor am Hitachi 704 Auotanalyser nach folgenden Methoden bestimmt (Tab. 9):

**Tab. 9: Serumparameter**

Parameter	Untersuchungsmethoden
ASAT	Optimierte Standardmethode <sup>1)</sup> „Fa. Roche“
β-HBS	Kitt-Nr. 310A „Fa. Roche“
Bilirubin	2,5 Dichlorphenyldiazonium-Methode „Fa. Roche“
γ-GT	L-γ-Glutamyl-Transferase-Methode „Fa. Roche“
GLDH	Optimierte Standardmethode „Fa. Roche“
Phosphor	Amoniummolybdat-Reaktion „Fa. Roche“

1) nach Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie

### 3.7. Leistungs- und Krankheitsdaten

Auf jedem der sieben Betriebe wurde monatlich eine Sicherungskopie des Herdenmanagement-Programms HerdeW® erstellt. Mit Hilfe des Programms Zuchtmanager® konnten die in Tab. 10 aufgeführten Daten ermittelt werden.

**Tab. 10: Parameter der verschiedenen Untersuchungsgebiete**

Untersuchungsgebiet	Parameter
Krankheit	Ketose, Labmagenverlagerung, Nachgeburtsverhaltung, Endometritis, Festliegen
Fruchtbarkeit	Rastzeit, Zwischentragezeit
Milchleistung	Einsatzleistung, 100-Tage-Leistung
Abgänge	Abgangsdatum, Abgangsursache

### **3.8. Statistische Methoden**

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS, Version 11.5. Zum Vergleich der Leberfettgehalte in den einzelnen Betrieben, im Jahresverlauf und zum Vergleich der Leistungs- und Fruchtbarkeitsparameter in den drei Leberfettgruppen wurde eine einfache Varianzanalyse (Anova) mit nachfolgendem Duncan-Test durchgeführt. Dabei war der Leberfettwert (%) die abhängige Variable. Die Berechnungen wurden für die Gesamtzahl an Proben und bei bestimmten Fragestellungen für die beiden Laktationsstadien getrennt durchgeführt. Wenn die Variable nur zweifach codiert war, wurde der t-Test anstelle der einfachen Anova durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei  $p \leq 0,05$ . Zum Vergleich der Leberfettwerte und der Parameter im Serum wurde die Korrelation nach Pearson berechnet.