

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Patienten

Die Patienten wurden zwischen März 1998 und März 2000 in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin vorgestellt. Die Kriterien für den Eingang in die Studie waren ein Hämatokritwert unter 0,25 l/l sowie eine vollständige diagnostische Aufarbeitung. In oben genanntem Zeitraum wurde von 2.804 Katzenpatienten in der Klinik ein Blutbild angefertigt, 132 Tiere (4,7 %) hatten bei Erstvorstellung oder im Laufe ihres stationären Aufenthaltes einen Hämatokritwert von unter 0,25 l/l. Bei 100 dieser 132 Katzen wurde eine umfangreiche Diagnostik durchgeführt, diese Tiere wurden in die Studie aufgenommen. Es wurden die Ergebnisse der Untersuchungen ausgewertet, die an dem Tag durchgeführt wurden, an dem der Hämatokritwert unter 0,25 l/l lag. Bei einigen Patienten wurden auch umfangreiche Verlaufskontrollen durchgeführt.

3.2 Eigene Untersuchungen

3.2.1 Anamnese

Eine ausführliche Anamnese wurde bei allen Katzen erhoben. Folgende Punkte wurden berücksichtigt und mittels eines Fragebogens an die Tierhalter (siehe Anhang, 9.3) erarbeitet:

Signalement (Alter, Geschlecht, Rasse und Gewicht)

Haltungsform (Freigänger, Wohnungskatze, als Einzeltier oder mit anderen Tieren)

Herkunft (Zuchtbestand, Tierheim, Findling, Bauernhof, Ausland etc.)

Impfstatus (Katzenseuche und –schnupfen, Leukose, FIP, Tollwut),

Datum der letzten Impfung, Entwurmung, Fütterung

Zeitpunkt des Auftretens der Erkrankung, Symptome bei Krankheitsbeginn

Häufigkeit und Farbe von Harn- und Kotabsatz

Vorbehandlungen

regelmäßige Medikamentengabe

frühere Erkrankungen und deren Medikation

Erkrankungen von Wurfgeschwistern und Verwandten

3.2.2 Klinische Untersuchung

Beurteilt wurden Allgemeinzustand, Rektaltemperatur, Farbe der Schleimhäute, Pulsfrequenz, Pulsqualität, kapilläre Füllungszeit, Atmung, Herz- und Lungenauskultation, Augen, Ohren, Nase und Maulhöhle, Haut und Haarkleid, Lymphknoten, Verdauungsapparat mit Palpation des Abdomens, Größe von Milz und Leber, Urogenitaltrakt, Farbe von Kot und Harn, Muskulatur und Skelett sowie das Nervensystem.

3.2.3 Röntgen- und Ultraschalluntersuchung

Der Thorax und das Abdomen wurden meist im latero-lateralen bzw. ventro-dorsalen Strahlengang geröntgt. Das Abdomen wurde in vielen Fällen zusätzlich sonographisch untersucht. Bei einigen Tieren wurde eine echokardiographische und eine sonographische Untersuchung des Herzens durchgeführt. Ergab die klinische Untersuchung Befunde einer Lahmheit oder Fraktur, so wurden die betroffenen Gliedmaßen ebenfalls geröntgt.

3.2.4 Hämatologische Untersuchungen

Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena cephalica, der Vena jugularis oder der Vena femoralis bzw. Vena saphena medialis. Die hämatologische Untersuchung wurde in der Regel mit EDTA-Blut, in einigen Fällen auch mit Natriumcitrat-Blut mit dem CELL DYN 3500 (Abbott, Wiesbaden) durchgeführt. Es wurden folgende Parameter ausgewertet: Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenzahlen, die Erythrozytenindizes MCV, MCH und MCHC, der Hämatokritwert und der Hämoglobingehalt.

Bei Agglutination der Erythrozyten erfolgte zusätzlich die Bestimmung des Mikrohämatokritwertes (Mikro-Hkt, Packed Cell Volume, PCV). Durch Aufsteigen des Blutes mittels Kapillarkraft wurde ein in die Blutprobe getauchtes Mikro-Hämatokritröhrchen (Brand, Wertheim) zu 3/4 bis 4/5 befüllt und anschließend in der Haemofuge (Heraeus Sepatech, Berlin) zehn Minuten bei 12.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokritwert durch Einlegen in eine Schablone abgelesen.

Es wurden Blutausstriche von EDTA-Blut, sowie einem Tropfen Blut, der nicht mit Antikoagulantien versetzt war angefertigt und nach Pappenheim gefärbt (siehe Kap. 3.2.4.5, 3.2.4.7)

Tab. 3-1: Referenzbereiche für die hämatologische Untersuchung nach KRAFT und DÜRR (1999);
¹ ruhige Katze, ² aufgeregtes Tier

Parameter	Einheit	Referenzbereich
Hämatokrit	l/l	0,30 – 0,44
Erythrozyten	T/l	5,0 - 10,0
Hämoglobin	mmol/l	5,6 - 9,3
MCV	fl	40 – 55
MCH	fmol	0,8 - 1,0
Leukozyten	G/l	6 - 11 ¹ (bis 18 ²)
Thrombozyten	G/l	180 – 550

3.2.4.1 Erythrozytenmorphologie

Die Beurteilung der Erythrozytenmorphologie erfolgte auf dem für das Differentialblutbild angefertigten Blutaussstrich (siehe Kap. 3.2.4). Beurteilt wurden die Größe, die Farbintensität (Hämoglobingehalt) und die Form der Erythrozyten sowie das Vorkommen von Howell-Jolly-Körpern, wobei bis zu 1 % der Erythrozyten einer gesunden Katze Howell-Jolly-Körper enthalten können (KRAFT et al., 1999).

3.2.4.2 Retikulozyten

Für die Zählung der Retikulozyten wurde in vorgefertigten Gefäßen (Sarstedt, Nümbrecht) 25 µl EDTA-Blut mit Brillantkresylblau zu einer 1 %-igen Lösung vermischt. Von dieser Lösung wurde nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 Minuten (max. vier Stunden) ein Ausstrich angefertigt, der nach Lufttrocknung bei 1.000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) beurteilt wurde. Es wurden 1.000 Erythrozyten ausgewertet, wobei zusätzlich eine Differenzierung in aggregierte Retikulozyten (entspricht den Retikulozyten Grad II und Grad III) und punktierte Retikulozyten (entspricht Grad I) durchgeführt wurde. Die Angabe der Retikulozytenzahl erfolgte zunächst in Prozent (relative Retikulozytenzahl), anschließend wurden nach folgenden Formeln die korrigierten und absoluten Retikulozytenzahlen ermittelt:

$$\text{Absolute Retikulozytenzahl } /\mu\text{l} = \frac{\text{Retikulozyten (\%)} \times \text{Erythrozytenzahl (Mio}/\mu\text{l)}}{100}$$

$$\text{Korrigierte Retikulozytenzahl (\%)} = \frac{\text{Retikulozyten (\%)} \times \text{Hämatokritwert des Patienten (\%)}}{\text{Hämatokritwert 37 \% (Normwert)}}$$

Tab. 3-2: Referenzwerte für Retikulozyten nach (KRAFT et al, 1999); ¹ nach (GIGER, 2000a)

Retikulozyten	
Relative Retikulozytenzahl %	0,5 – 2,0
Absolute Retikulozytenzahl / μ l	< 40.000
Korrigierte Retikulozytenzahl %	< 0,4 ¹

3.2.4.3 Heinzsche Innenkörper

Heinzsche Innenkörper (HK) wurden auf dem für die Retikulozytenzählung angefertigten Blutausstrich (siehe Kap. 3.2.4.2) nachgewiesen und ausgezählt. Ihre Anzahl pro 100 Erythrozyten wurde in Prozent angegeben. Angegeben wurde die Anzahl an HK wenn sie über 5 % lag.

3.2.4.4 Erythrozytenagglutination

Die Prüfung auf Erythrozytenagglutination erfolgte zunächst makroskopisch. Eine starke spontane Erythrozyten war häufig bereits an der Wand des Probengefäßes erkennbar. Zur Beurteilung wurde ein Tropfen EDTA-Blut auf einen Objektträger gegeben, nach Schwenken des Objektträgers wurde das Blut auf Agglutination überprüft. Um agglutinierende Erythrozyten von einer Rouleaux-Bildung unterscheiden zu können, wurde dem Blutstropfen physiologische Kochsalzlösung zugesetzt. War makroskopisch keine Agglutination sichtbar, wurde der Objektträger bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop beurteilt. Bei Vorliegen einer Agglutination wurden das Blut mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt und für eine Minute bei 1000 g zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus Sepatech) dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurde die Agglutination auf einem Objektträger erneut überprüft. Wurde auch nach der Waschung eine makroskopische und mikroskopische Agglutination der Erythrozyten festgestellt, handelte es sich um eine persistierende Objektträgeragglutination. Der Grad der Agglutination wurde von + bis +++ (1+ bis 3+) angegeben.

3.2.4.5 Differentialblutbild

Blutausstriche von EDTA-Blut wurden nach Pappenheim gefärbt und bei 1.000-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop STANDARD 20 (Fa. Zeiss, Jena) im Ölimmersionsfeld ausgewertet. 100 Leukozyten wurden differenziert und zunächst in relativen Zahlen angegeben, danach die absoluten Zahlen berechnet. Referenzbereiche siehe Tab. 3-3.

Tab. 3-3: Referenzbereiche für das Differentialblutbild nach (KRAFT et al., 1999)

Zellen	Relative Zahlen (%)	Absolute Zahlen (G/l)
Leukozyten		6 – 18
Neutrophile segmentkernige Granulozyten	60 – 78	3 – 11
Neutrophile stabkernige Granulozyten	0 – 4	0 – 0,6
Eosinophile Granulozyten	0 – 6	0,04 – 0,6
Basophile Granulozyten	0 - < 1	0 - <0,04
Monozyten	0 – 4	0,04 – 0,5
Lymphozyten	15 – 38	1 – 4

3.2.4.6 Normoblasten

Bei der Anfertigung des Differentialblutbildes (siehe Kap. 3.2.4.5) wurde die Anzahl an Normoblasten ermittelt. Die Angabe ihrer Anzahl erfolgte pro 100 Leukozyten.

3.2.4.7 Nativausstrich

Ein Tropfen Blut, der nicht mit Antikoagulantien versetzt war, wurde auf einem Objektträger ausgestrichen, luftgetrocknet und anschließend nach Pappenheim gefärbt. Bei der Durchmusterung unter dem Mikroskop bei 1.000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion wurde auf Blutparasiten, insbesondere *Hämobartonella felis*, geachtet.

3.2.4.8 Thrombozytenzählung

Bei niedrigen Thrombozytenzahlen in der automatischen Zählung wurde die Anzahl durch manuelle Zählungen (Thromboplus, Sarstedt, Nümbrecht) oder Schätzungen im Blutausstrich verifiziert. Die Schätzung der Thrombozytenzahl wurde an einem nach Pappenheim gefärbten Blutausstrich bei 1.000-facher Vergrößerung im Ölimmersionfeld durchgeführt. (Referenzbereiche siehe Tab. 3-1).

3.2.5 Klinisch-chemische Blutuntersuchung

Die Bestimmung von Natrium, Kalium, Glukose und Harnstoff erfolgte mit Lithium-Heparinplasma mit dem ELECTROLYTE-14⁺-ANALYZER (Fa. Nova Biomedicals, Rödermark). Aus Lithium-Heparinplasma wurden im Analysegerät COBAS MIRA PLUS (Fa. Roche Diagnostica, Grenzach-Whylen) die in Tab. 3-4 aufgeführten Werte bestimmt.

Tab. 3-4: Referenzwerte: klinisch-chemische Blutuntersuchung nach KRAFT et al., 1999, ¹TVEDTEN, 1999b

Parameter	Einheit	Referenzbereich
Albumin	g/l	26 - 56
Alkalische Phosphatase (AP)	nkat/l	66 – 1.350 ¹
Alanin-Amino-Transferase (ALT)	nkat/l	< 1.167
Aspartat-Amino-Transferase, (AST)	nkat/l	< 500
Bilirubin	µmol/l	< 3,4
Calcium	mmol/l	2,3 – 3,0
Cholesterin	mmol/l	1,8 - 3,9
Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)	nkat/l	< 100
Harnstoff	mmol/l	5 – 11,3
Kalium	mmol/l	3,0 – 4,8
Kreatinin	µmol/l	0 – 168
Natrium	mmol/l	145 – 158
Phosphat	mmol/l	0,8 – 1,9
Protein	g/l	57 – 94

Durch Subtraktion des Albuminwertes vom Gesamtproteingehalt im Plasma wurde der Globulinwert bestimmt, aus dem der Albumin/Globulin-Quotient ermittelt wurde. Der Referenzbereich für das Verhältnis von Albumin zu Globulin liegt zwischen 0,6 und 1,2 (KRAFT und DÜRR, 1999).

3.2.6 Plasmatische Gerinnung

Die Bestimmung der plasmatischen Gerinnung erfolgte mit Natrium-Citrat-Plasma. Die PT und PTT wurden mit dem Koagulometer nach Schnitger und Gros (Amelung, Lemgo) ermittelt. Zur Bestimmung der PT (TPZ, Quick-Test) wurde das Reagenz HEPATO-QUICK (Boehringer, Mannheim), ein Gewebsthromboplastin mit Calcium-Ionen, dem Citratplasma zugesetzt. Die PTT wurde ermittelt, indem das Citratplasma mit dem Reagenz PATHROMTIN (Dade Behring, Marburg), einem Oberflächenaktivator und einem partiellen Thromboplastin, versetzt wurde. Referenzwerte für die plasmatische Gerinnung sind in Tab. 3-5 aufgeführt.

Tab. 3-5: Referenzwerte für die plasmatische Gerinnung bei der Katze (Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, FU Berlin)

Referenzwerte für die plasmatische Gerinnung	Einheit (Sekunde)	Referenzbereich
PT (Prothrombinzeit, Thromboplastinzeit)	Sek.	16,5 - 27,5
PTT (aktivierte Thromboplastinzeit)	Sek.	14 - 25

3.2.7 Harnuntersuchung

Die Untersuchung des per Zystozentese oder spontan gewonnenen Harns erfolgte mit dem COMBUR 9-Test (Boehringer, Mannheim), die Auswertung des Teststreifens visuell anhand der Farbindikatoren. Mit dem Teststreifen wurden Nitrit, pH-Wert, Protein, Glucose, Ketonkörper, Urobilinogen, Bilirubin und Blut im Harn semiquantitativ optisch sichtbar gemacht. Das spezifische Gewicht des Harns wurde mit dem Refraktometer (Atago, Uricon-N, Japan) ermittelt. Nach Zentrifugieren des Harns wurde das Sediment mikroskopisch ausgewertet, dabei wurde auf organische Bestandteile wie Erythrozyten, Leukozyten, die verschiedenen Epithelien (tubuläre Epithelzellen, Übergangsepithelien und Plattenepithelien) und Harnzylinder sowie kristalline Bestandteile geachtet.

3.2.8 Knochenmarkuntersuchung

Die Entnahme von Knochenmark erfolgte aus dem Tuberculum majus humeri oder dem Tuberculum sacrale unter allgemeiner Anästhesie mit Diazepam (Diazepam ratiopharm®, ratiopharm, Ulm) in einer Dosierung von 0,5 mg/kg und Propofol (Rapinovet®, Mallinckrodt Vet GmbH, Burgwedel) in einer Dosierung von 0,3 mg/kg. Nach chirurgischer Vorbereitung der Punktionsstelle wurde die Punktionskanüle nach einer kleinen Hautinzision unter Drehbewegungen in den Knochen vorgeschoben. Nach Entfernung des Mandrins der Punktionskanüle wurde über eine Spritze, in die 0,2 ml Natriumcitrat 3,13 % (Braun, Melsungen) vorgelegt wurde, Knochenmark aspiriert. Das so gewonnene Knochenmark wurde auf einem Objektträger ausgestrichen, nach Pappenheim gefärbt und anschließend unter dem Mikroskop bei 1.000-facher Vergrößerung (Ölimmersion) untersucht, auf folgende Kriterien wurde geachtet: Zellularität, Megakaryopoese, Verhältnis von myeloiden (M) zu erythroiden (E) Zellen (Ermittlung des M:E-Index), Zellreifung und das Vorkommen von neoplastischen Zellen.

3.2.9 Osmotische Fragilität der Erythrozyten

Die Bestimmung der mittleren osmotischen Fragilität der Erythrozyten wurde parallel zu den anämischen Katzen bei 56 nicht anämischen Kontrolltieren durchgeführt. Diese Katzen waren klinisch gesund oder waren zur Behandlung von orthopädischen Erkrankungen bzw. Routineoperationen wie Kastrationen oder Zahnbehandlungen in der Klinik vorstellig geworden. Für die Bestimmung der MOF wurde in unterschiedlich konzentrierte Salzlösungen Blut pipettiert und nach einer Inkubationszeit mit anschließendem Zentrifugieren die optische Dichte des Überstands photometrisch bestimmt.

Bei drei Kontrolltieren wurde der Hämatokritwert der Blutprobe durch Zugabe von PBS bzw. Entfernung von Plasma verändert und anschließend wie die anderen Proben analysiert. Die durch die photometrische Messung ermittelten Werte wurden in ein Koordinatensystem übertragen, in dem auf der Ordinate die Konzentration der Salzlösung und auf der Abszisse der Grad der Hämolyse eingetragen wurde, wobei der höchste gemessene Wert 100 % entsprach. Auf der so entstandenen Kurve wurde bei 50 % Hämolyse auf der Ordinate diejenige Konzentration ermittelt, bei der die Hälfte der Erythrozyten lysiert waren, sie entsprach der mittleren OF (MOF).

Aus 45 g Natriumchlorid, 6,83 g Natriumbikarbonat und 0,94 g Natriumkarbonat wurde unter Zusatz von Aqua dest. 500 ml einer 9 %-igen gepufferten Stammlösung hergestellt. 3.200 ml destilliertes Wasser und 400 ml der Stammlösung wurden vermischt, um eine 1 %-ige gepufferte Arbeitslösung zu erhalten. Aus dieser Arbeitslösung wurden unter Zugabe von destilliertem Wasser unterschiedlich konzentrierte Salzlösungen hergestellt, deren Osmolalität im Osmometer (Osmomat, Cryoscopic Osmometer Printer, Gonoth, Berlin) überprüft wurde. Der pH-Wert der Lösungen wurde im Radiometer Copenhagen ABL600 (Radiometer, Willich) gemessen. Der pH-Wert der 1 %-igen Arbeitslösung lag bei 7,46, die Werte der fertigen Lösungen lagen zwischen 7,39 und 7,46. Zur Ermittlung der MOF wurde je nach Hämatokritwert 400 bis 800 µl EDTA-Blut benötigt. Die Blutproben wurden zunächst entsprechend ihres Hämatokritwertes vorbereitet, indem durch Entfernung von Plasma nach Zentrifugieren der Blutprobe bei 1.500 U/Min. für 30 Sek., bzw. Zusetzen von PBS zur Probe, ein Hämatokritwert von 25 bis 30 % erzielt wurde. Der Testansatz bestand aus 13 Teströhrchen (Sarstedt, Nümbrecht). In die ersten zwölf wurden jeweils 2 ml der zwölf unterschiedlich konzentrierten Lösungen (siehe Tab. 3-6) pipettiert. Röhrchen Nr. 13 wurde mit 2 ml 0,85 %-iger Lösung gefüllt und wie die anderen im Wasserbad bei 22°C inkubiert.

In die zwölf ersten Röhrchen wurden jeweils 15 µl der vorbereiteten Blutprobe pipettiert, anschließend folgte eine Inkubationszeit von 30 Min. im Wasserbad bei 22°C. Erst nach Ablauf der 30 Min. wurde auch in das dreizehnte Röhrchen 15 µl Blut gegeben und anschließend ohne weitere Inkubation mit den zwölf anderen Röhrchen für 10 Min. bei 2000 U/Min. zentrifugiert. Im Photometer EPPENDORF PCP 6121 (Eppendorf Gerätebau, Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) wurde danach der Überstand in den Röhrchen bei 546 nm photometrisch gemessen.

Der Wert des nach der Inkubationszeit beschickten Röhrchens war der 0-Wert (Basis-hämolyse), das heißt die Hämolyse, die bereits ohne Inkubationszeit vorlag. Sie wurde von allen anderen Extinktionen subtrahiert. Die größte gemessene Extinktion wurde nun gleich 100 % Hämolyse gesetzt und alle anderen in das Verhältnis dazu. Anschließend wurden die Werte in ein Koordinatensystem eingetragen und an der Ordinate der Wert abgelesen, bei dem 50 % der Erythrozyten lysiert waren (MOF).

Tab. 3-6: Angaben über Konzentration und Mischungsverhältnis der verwendeten Salzlösungen, ihre Osmolalität und ihr pH-Wert

Salzlösung %	Arbeitslösung ml	Aqua dest. ml	Osmolalität Osmol/kg	pH - Wert
0,85	425	75	0,29	7,39
0,80	400	100	0,28	7,42
0,75	375	125	0,26	7,40
0,70	350	150	0,24	7,44
0,65	325	175	0,22	7,39
0,60	300	200	0,21	7,41
0,55	275	225	0,19	7,46
0,50	250	250	0,17	7,46
0,45	225	275	0,16	7,43
0,40	200	300	0,14	7,45
0,35	175	325	0,12	7,44
0,25	125	375	0,09	7,44

3.2.10 Direkter Antiglobulin-Test (Coombs-Test)

Antierthrozytäre Antikörper wurden mit dem direkten Coombs-Test, gemäß dem in der Arbeitsgruppe Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführten Verfahren, nachgewiesen. Neben den anämischen Patienten wurde auch eine Kontrollgruppe von vierzehn Katzen getestet. Fünf dieser Tiere waren klinisch gesund und neun Katzen waren nicht anämisch, litten aber an unterschiedlichen Erkrankungen. Je nach Höhe des Hämatokritwertes wurden 1,0 bis 1,5 ml EDTA-Blut für die Durchführung des Tests benötigt. Jeweils eine Hälfte des Blutes wurde für den Kaltansatz bei 4°C, bzw. für den Warmansatz bei 37°C über einen Zeitraum von 30 Min. inkubiert.

Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen der Erythrozyten mit entsprechend temperierter "Phosphate Buffered Saline" (PBS) (Dulbecco, Biochrom, Berlin). Bei jedem Waschen wurden die Erythrozyten vorsichtig und gründlich mit PBS vermischt und anschließend bei 1.500 U/Min. 20 Sek. lang zentrifugiert. Spülflüssigkeit und Leukozytensaum (buffy-coat) wurden nach dem Zentrifugieren vorsichtig abpipetiert.

Für das Waschen des für den Kaltansatz benötigten Erythrozytenkonzentrats wurde auf 4°C gekühltes und für den Warmansatz auf 37°C erwärmtes PBS verwendet. Aus dem nach dem letzten Waschen entstandenen Erythrozytenkonzentrat wurde für die beiden Temperaturbereiche jeweils eine 1:40 Suspension hergestellt. Als Verdünnungsmittel wurde R2F-Lösung verwendet, die aus dem Flüssigmedium RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO₃ und 5 mg/l Phenolrot (Biochrom, Berlin) sowie einem 10 %-igen Zusatz von fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin) besteht. Die verwendeten Antiseren waren monospezifisch. Für den Nachweis von IgG wurde GOAT-ANTI-CAT IgG (H+L) (Dianova, Hamburg) und für IgM GOAT-ANTI-CAT IgM (Bethyl, Montgomery/Texas, USA, Vertrieb über Natutec, Frankfurt/Main) benutzt, für C3 SHEEP-ANTI-CAT C3 (The Binding Site GmbH, Heidelberg).

Die Antiseren wurden mit PBS im Verhältnis 1:10 (IgG, IgM) und 1:5 (C3) verdünnt, in Aliquots von 500 µl bei -80°C eingefroren und bei Bedarf aufgetaut. Mit PBS wurde für den Test eine Verdünnungsreihe von 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 und 1:640 mit dem jeweiligen Antiserum angefertigt. Die Verdünnungsreihe von C3 wurde in Stufen von 1:10 bis 1:320 hergestellt. Die Testansätze wurden in 96-fach Rundboden-Mikrotiterplatten (Sarstedt, Nümbrecht) für 4° und 37°C vorbereitet. In die Vertiefungen der Mikrotiterplatten wurde, jeweils doppelt, jede der Verdünnungsstufen der drei Antiseren sowie als Negativkontrollen PBS und fetales Kälberserum in einer Menge von 20 µl pipettiert. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten bei 4°C und 37°C inkubiert. Nach ca. 30 Minuten wurde in jeden Ansatz der Verdünnungsstufen und in die Negativkontrollen 20 µl der entsprechend temperierten Erythrozytensuspension pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde dann gründlich gerüttelt, um eine vollständige Vermischung zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von ca. 90 Minuten bei 4° bzw. 37°C konnte der Test abgelesen werden.

Ein negatives Testergebnis lag vor, wenn sich am Boden der Mikrotiterplatte ein scharf begrenzter "Erythrozytenknopf" gebildet hatte. Bei einem positiven Testergebnis kam es zu einer Agglutination der Erythrozyten, was sich auf dem Boden der Mikrotiterplatte in Form einer „Erythrozytenmatte“ darstellte. Bei sehr starker Agglutination zeigten diese „Matten“ zusammengefaltete Randbereiche. Zur Absicherung der im Hause durchgeführten Testergebnisse wurden auch Blutproben in die Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover zur Untersuchung eingeschickt.

3.2.11 Felines Leukosevirus (FeLV)–Test

Der Nachweis einer Infektion mit dem felinen Leukosevirus (FeLV) erfolgte mit dem FAS-Test® FeLV (Mega Cor Diagnostik GmbH, Hörbranz, Österreich). Der Test basiert auf einem immunchromatographischen "Sandwich"-Prinzip. Auf einer mit Antikörpern gegen das p27-Protein des FeLV beschichteten Fliessmembran wandert das Probenmaterial (Plasma, Serum oder Vollblut). Ist das Virus in der Probe vorhanden, kommt es zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes, der von einem membranfixierten Antikörper im Ergebnisfenster abgefangen wird und sich in Form eines violetten Streifens darstellt.

3.2.12 Felines Immunschwächevirus (FIV)-Test

Eine Infektion mit dem Felinen Immunschwächevirus (FIV) wurde mit dem FASTest® FIV (Mega Cor Diagnostik GmbH, Hörbranz, Österreich) nachgewiesen. Nach einem immunchromatographischen "Sandwich"-Prinzip wurden Antikörper gegen Anteile des FIV in Heparin-Plasma nachgewiesen. Die Fließmembran, auf der das Probenmaterial wandert, ist mit dem Transmembranprotein gp40 des FIV beschichtet. Bei Vorliegen von Antikörpern gegen dieses Protein in der Blutprobe kommt es zur Bildung eines Antikörper-Antigen-Komplexes, der auf der Membran weiterwandert und von einem membranfixierten Peptid im Ergebnisfenster abgefangen wird. Der abgefangene Antikörper-Antigen-Komplex wird in Form eines violetten Streifens im Ergebnisfenster sichtbar.

3.2.13 Felines Infektiöses Peritonitisvirus (FIP)

Serum oder Heparin-Plasma wurden serologisch auf das Vorliegen von Immunkomplexen des Virus der Felinen Infektiösen Peritonitis (FIP) untersucht. Der Nachweis erfolgte im Institut für Veterinär-Pathologie der Universität Leipzig mit einem kompetitiven Enzymimmuntest (ELISA). In einigen Fällen wurde im Serum der Patienten im Labor Laboklin, Bad Kissingen der Coronavirus-Antikörper-Titer bestimmt.

3.2.14 Serum-Eisen

Die Bestimmung des Serum-Eisengehaltes wurde im Labor Laboklin, Bad Kissingen, durchgeführt. Die quantitative Bestimmung erfolgte dort im HITACHI 717 (Roche Diagnostica, Grenzach). Die Referenzwerte für den Serum-Eisengehalt bei der Katze liegen zwischen 14 und 20 µmol/l (TVEDTEN, 1993).

3.2.15 Serum-Erythropoetin

Die quantitative Bestimmung des Erythropoetin (EPO) im Patientenserum erfolgte mittels eines Testkits für die Humanmedizin (Fa. Medac, Hamburg). Dieser Test wurde in der Immunologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt. Die Höhe der Extinktion ist proportional zu der Konzentration an EPO im Serum. Normwerte für Erythropoetin liegen bei 0 bis 20 U/l.

3.2.16 Antinukleäre Antikörper - Titer

Der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) im Serum erfolgte bei einer Katze bei Laboklin, Bad Kissingen. Es wurde dort ein vorbereitetes Testkit (Fa. Viva Diagnostika, Hürth) verwendet. Ein positives Ergebnis lag vor, wenn der Titer $\geq 1:100$ betrug.

3.2.17 Zytologische Untersuchung von Biopstaten

Bei einigen Tieren wurde eine Feinnadelaspirationsbiopsie von verschiedenen Organen vorgenommen. Das so gewonnene Zellmaterial wurde auf einem Objektträger verteilt und nach Lufttrocknung nach Pappenheim angefärbt. Die Untersuchung erfolgte bei 400-facher und 1000-facher Vergrößerung (Mikroskop Axiophot, Zeiss, Jena).

3.2.18 Histopathologische Untersuchung, Sektion

Die histopathologische Untersuchung von Gewebeproben und Sektionen wurden im Institut für Veterinär-pathologie der Freien Universität Berlin durchgeführt. Die Katzen, die wegen aussichtsloser Prognose euthanasiert wurden oder verstarben, wurden nach Möglichkeit histopathologisch untersucht. Die pathologisch-anatomische und histologische Untersuchung wurde im Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin vorgenommen.

3.3 Statistik

Die graphische Gegenüberstellung der Ergebnisse der Blutuntersuchungen der unterschiedlichen Anämieformen erfolgte durch die Erstellung von "Box- & Whiskers-Plots". Dabei gibt die "Box" den Bereich zwischen dem 25 %- und dem 75 %-Quartil an, sie schließt also 50 % der Werte ein. Der Median (M) wird innerhalb der "Box" als horizontale Linie angegeben. Die "Whiskers" (Intervalle) werden oben und unten in einfacher Boxenlänge an die "Box" gehängt und verkürzt, falls die Werte nicht den gesamten Bereich einnehmen. Die Whiskersgrenzen stellen einen Bereich unauffälliger Variabilität dar. Werte außerhalb der Grenzen werden im Diagramm als einzelne "Sternchen" dargestellt. Die Erstellung der "Box- & Whiskers-Plots" und die Ermittlung von Mittelwert (\bar{x}), Median (M), Standardabweichung, Minimum und Maximum erfolgte mit Hilfe des Software-Programms "SPSS for Windows, Release 6.1.". Die Stab- und Kreisdiagramme wurden unter Anwendung des Software-Programmes "Microsoft Excel, Version 7.0 "erstellt.