

3 Material und Methoden

3.1 Untersuchungsmaterial

Im Einzugsgebiet einer tierärztlichen Praxis in Niedersachsen (Kreis Cuxhaven) wurden im Verlaufe eines Jahres 200 Kühe aus 52 landwirtschaftlichen Betrieben mit der klinischen Diagnose „Milchfieber“ in die Untersuchungen einbezogen. Nach Vorliegen der Laborbefunde konnte bei 167 Kühen die Diagnose „Gebärparese“ bestätigt werden.

Diese Tiere unterschiedlichen Alters stammten aus Betrieben mit einer durchschnittlichen Herdenmilchleistung von 8.500 Litern, bei einer Spannweite von 7.000 bis 11.000 Litern. Die mittlere Herdengröße betrug 80 Kühe, wobei in einem Betrieb nur 40 Tiere gehalten wurden und der größte Betrieb etwa 200 Kühe umfasste. Die Haltungsformen und Fütterungsregime waren unterschiedlich. Die allgemein übliche Futtermischung bestand aus einer Grundration aus Gras- und Maissilage, die zum Ausgleich der Energie-Eiweiß-Bilanz mit Getreide- bzw. Sojaschrot ergänzt wurde. In Abhängigkeit von der Milchleistung wurde den Tieren ein handelsübliches Milchleistungsfutter angeboten. Die Zuteilung des Kraftfutters erfolgte am häufigsten über die Transponderfütterung, gefolgt von der manuellen Zuteilung und in geringerem Ausmaß über die Totalmischung (TMR). Die Aufstallung in Laufställen war am häufigsten vertreten, aber auch die Anbindehaltung kam vereinzelt vor. Auf einigen Betrieben wurden die trockenstehenden Kühe auf der Weide gehalten und auch die laktierenden Tiere hatten teilweise einige Stunden Weidegang am Tag. Die Betriebe lagen auf Geest- und Marschland.

3.2 Untersuchungsmethodik

Alle Tiere, die peripartal Festliegen oder Schwanken in der Hinterhand zeigten und bei denen die klinische Diagnose „Gebärparese“ lautete, wurden in die Untersuchung mit einbezogen.

Die Tiere wurden mit Beginn der Erstbehandlung entweder der „Versuchsgruppe“ (Applikation von Vitamin D₃) oder der „Kontrollgruppe“ (keine Applikation von Vitamin D₃) zugeordnet. Die Randomisierung der Gebärparesekühe in die entsprechende Therapiegruppe erfolgte entsprechend dem Patientenfall in alternierender Reihenfolge.

Der Behandlungsplan für die Erstbehandlung der jeweiligen Therapiegruppe ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Tabelle 2: Behandlungsplan für die Erstbehandlung in der Versuchs- bzw. Kontrollgruppe.

Therapiegruppe	Arzneimittel	Menge	Art der Applikation	Pharmazeutischer Unternehmer
Erstbehandlung der Versuchsgruppe	Dexamethason – Injektionslösung ®	15 ml	i.v.	Pharma Partner
	C-B-Glukonat 24 plus 6 ®	500 ml	i.v.	Alvetra GmbH
	C-B-Gluconat 24 plus 6 ®	200 ml	s.c.	Alvetra GmbH
	D3-Vitamin Kristallin oleo solutum ®	10 ml	i.m.	Eurovet Animal Health
Erstbehandlung der Kontrollgruppe	Dexamethason – Injektionslösung ®	15 ml	i.v.	Pharma Partner
	C-B-Glukonat 24 plus 6 ®	500 ml	i.v.	Alvetra GmbH
	C-B-Gluconat 24 plus 6 ®	200 ml	s.c.	Alvetra GmbH

Bei erforderlichen Nachbehandlungen wurden die Tiere nach dem in der Tabelle 3 angegebenen Behandlungsplan therapiert.

Tabelle 3: Behandlungsplan für die Nachbehandlungen in der Versuchs- und Kontrollgruppe.

Therapiegruppe	Arzneimittel	Menge	Art der Applikation	Pharmazeutischer Unternehmer
Nachbehandlung der Versuchsgruppe und Kontrollgruppe	C-B-Glukonat 24 plus 6 ®	500 ml	i.v.	Alvetra GmbH
	Glucose-Lösung 40 Prozent ad us. vet ®	500 ml	i.v.	B. Braun Melsungen AG

Eine genauere Spezifikation der eingesetzten Arzneimittel liefert die Tabelle 4.

Tabelle 4: Wirkstoffgehalt der eingesetzten Arzneimittel.

Arzneimittel	Wirkstoff	Wirkstoffgehalt
C-B-Gluconat 24 plus 6 ®	Kalziumgluconat • H ₂ O	24,0 g / 100 ml Lösung
	Borsäure	6,0 g / 100 ml Lösung
	Magnesiumchlorid • 6H ₂ O	6,0 g / 100 ml Lösung
Dexamethason-Injektionslösung ®	Dexamethason-21-dinatriumphosphat	2,64 mg / 1 ml Lösung (entspricht 2,00 mg Dexamethason / 1 ml Lösung)
D ₃ -Vitamin Kristallin Oleo Solutum ®	Colekalziferol	1.000.000 IE / 1 ml
Glucose-Lösung 40 Prozent ad us. vet ®	wasserfreie Glucose	400g/1000ml

3.2.1 Anamnese und klinische Untersuchung

Bei der Erhebung der speziellen Anamnese wurde zunächst die Laktationsnummer des Patienten notiert. Der Zeitpunkt der Erkrankung wurde in Relation zur Kalbung ermittelt und in Stunden angegeben. Als weitere Information zum Patienten wurde erfragt, ob die Kuh spontan gekalbt hatte oder ob Geburtshilfe geleistet wurde. Wenn eine Schweregeburt vorlag, wurde dies zusätzlich festgehalten.

Vor jeder Behandlung erfolgte eine klinische Untersuchung des Patienten. Die Körperkondition wurde mit Hilfe des Body Condition Score (BCS) ermittelt. Die Körpertemperatur wurde rektal mit dem Thermometer gemessen. Anschließend wurde das Allgemeinbefinden beurteilt. Es wurde festgehalten, ob das Sensorium ungestört war, oder ob eine geringgradige bzw. hochgradige Störung vorlag. Sofern das Stehvermögen der Kühe nicht mehr erhalten war, wurde vermerkt, ob diese in Brust- oder Seitenlage festlagen.

3.2.2 Entnahme der Blutproben

3.2.2.1 Zeitpunkt und Art der Blutentnahme

Die Entnahme der Blutproben erfolgte durch Punktion der Drosselvene (Vena jugularis externa) unmittelbar vor jeder Behandlung.

War die Therapie erfolgreich, sodass die Milchkuh sich erheben konnte und nicht erneut an einem Rezidiv erkrankte, schlossen sich keine weiteren Blutentnahmen an.

Für Nachbehandlungen wurden die Landwirte darauf aufmerksam gemacht, daß die erste Nachbehandlung nach 6 bis 8 Stunden zu erfolgen hat und weitere Nachbehandlungen im Abstand von 12 Stunden zur jeweils vorhergehenden Behandlung zu erfolgen haben.

Entsprechend erfolgte eine zweite Blutentnahme im Abstand von 6 bis 12 Stunden zur Erstbehandlung. Die unterschiedliche Zeitdauer zwischen erster und zweiter Probennahme ergab sich daher daraus, daß diese Versuche unter Praxisbedingungen durchgeführt wurden und der Zeitpunkt der Nachbehandlung vom Besitzer abhing, der die Konsultierung des Tierarztes von einer intensiven Tierbeobachtung abhängig machte.

Wurde eine dritte Blutentnahme notwendig, erfolgte diese im Abstand von 12 bis 24 Stunden zur Zweitbehandlung. Für die unterschiedliche Zeitdifferenz gelten die zur zweiten Probennahme gemachten Aussagen in Analogie.

3.2.2.2 Serumgewinnung

Nach einer Ruhezeit von 5-7 Stunden wurden die Blutproben zentrifugiert (10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute). Das so gewonnene Serum wurde dekantiert und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

3.2.2.3 Parameter und Bestimmungsmethoden

Die Analytik der Blutparameter erfolgte im „Institut für klinische Prüfung Ludwigsburg GmbH - Veterinärmedizinisches Labor“. Zur Bestimmung der einzelnen Parameter wurden die in der Tabelle 5 aufgeführten analytischen Methoden und Geräte eingesetzt.

Tabelle 5: Labordiagnostische Methoden und Geräte.

Parameter	Maßeinheit	Methode und Gerät
Kalzium	mmol/l	fotometrische Bestimmung mittels
anorgan. Phosphat	mmol/l	Endpunktmethode am Hitachi 747
Magnesium	mmol/l	vollautomatische fotometrische Bestimmung (quantitative Bestimmung)
AST (GOT)	U/l	enzymkinetische Bestimmung am Modular
CK	U/l	
GLDH	U/l	
β -Hydroxybuttersäure	mg/l	fotometrische Bestimmung mittels Endpunktmethode am Hitachi 747
Gesamt-Bilirubin	mg/dl	fotometrische Bestimmung mittels Endpunktmethode am Modular
Harnstoff-N	mg/dl	quantitative Bestimmung am Modular mittels des gekoppelten Enzyms Urease/Glutamat- Dehydrogenase
Cholesterin	mg/dl	vollautomatische fotometrische Bestimmung

3.2.3 Entnahme der Leberproben

3.2.3.1 Leberbiopsieproben

Von jeder Kuh wurden zum Zeitpunkt der Erstbehandlung Leberbiopsieproben entnommen, die in Kupfersulfatlösungen genau eingestellter spezifischer Dichte im semiquantitativen Verfahren auf ihren Fettgehalt untersucht wurden.

3.2.3.2 Leberbiopsietechnik

Lebergewebsproben wurden durch perkutane Nadelbiopsie auf der rechten Seite des Tieres im elften Intercostalraum gewonnen. Da die Punktion in Abhängigkeit von der Körperhaltung der Patienten größtenteils bei der festliegenden Kuh durchgeführt wurde, wurden zur Bestimmung der genauen Einstichlokalisation drei verschiedene Systeme von Hilfslinien in absteigender Priorität angewendet, d.h. das zweite und dritte Hilfsliniensystem dienten zur Bestätigung der sich im ersten Hilfsliniensystem ergebenden Einstichlokalisation. Die Systeme sind in der Abb. 1 schematisch dargestellt.

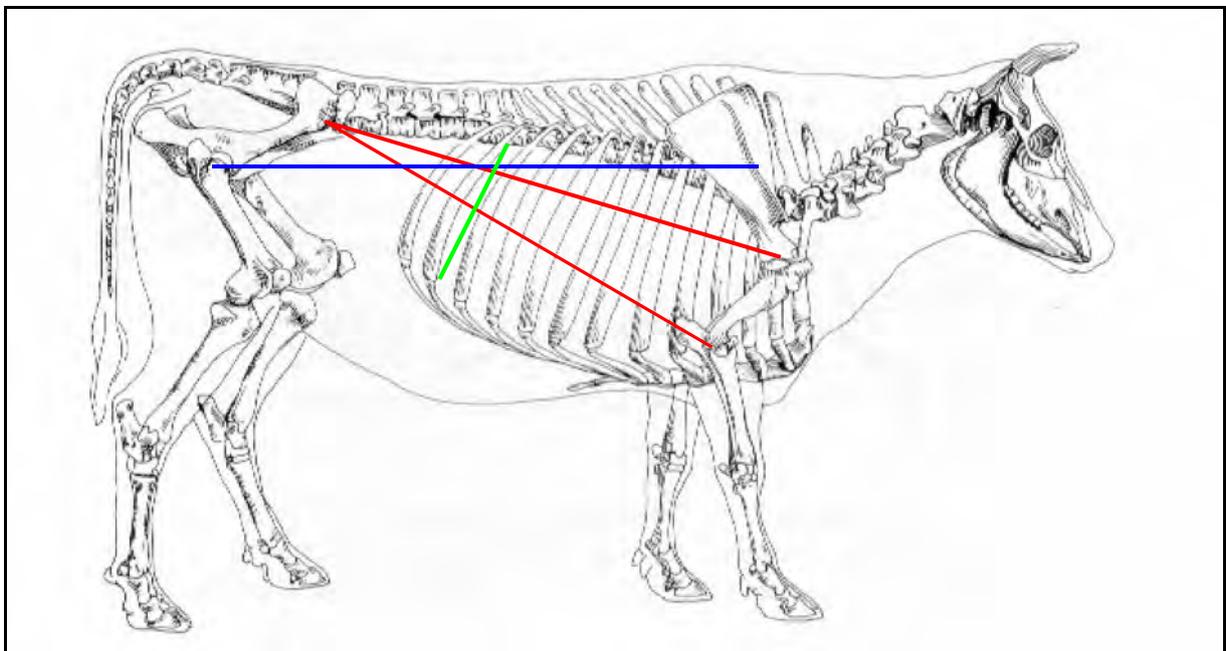


Abb. 1: Topographisch anatomische Bestimmung der Punktionsstelle der Leber mittels verschiedener Hilfsliniensysteme.

(— blaue Linie — erstes Hilfsliniensystem, — grüne Linie — zweites Hilfsliniensystem, — rote Linie — drittes Hilfsliniensystem)

Entsprechend dem ersten Hilfsliniensystem erfolgte die Punktion der Leber im elften Intercostalraum unterhalb der Ebene des Trochanter major ossis femoris. Die Bestätigung der Punktionsstelle erfolgte mit dem zweiten Hilfsliniensystem, nach dem die Leberpunktion im Bereich des Übergangs zwischen dem oberen und mittleren Drittel des elften Intercostalraumes zu erfolgen hat. Zur weiteren Absicherung der genauen Einstichlokalisation wurde ein drittes Hilfsliniensystem herangezogen. Nach diesem System erfolgte die Punktion im elften Intercostalraum in einem Bereich, der durch zwei Linien begrenzt wird. Eine dieser beiden Linien verbindet den Tuber coxae mit dem Buggelenk, während die andere vom Tuber coxae zum Olecranon verläuft.

Nach Bestimmung der Einstichstelle wurde ein 2 * 2cm großer Bezirk rasiert und desinfiziert. Nach der Lokalanästhesie mit 2 ml Procainhydrochlorid, das zu gleichen Teilen subcutan und intramuskulär injiziert wurde, erfolgte mit dem Skalpell eine Stichinzision unter Durchtrennung von Haut und Unterhaut. Danach wurde die Leberbiopsienadel (Berliner Model, d=2,5mm. 25cm, Eickemeyer® Medizintechnik für Tierärzte, Tuttlingen, Deutschland) in kranio-medialer Richtung auf den kontralateralen Ellenbogen eingeführt. Dabei gab sich das Erreichen und Eindringen der Biopsienadel in die Leber als charakteristischer Widerstand zu erkennen (körnig-knirschende Lebergewebstextur). Nach dem Eindringen der Biopsienadel in die Leber wurde die als Mandrin in der Kanüle liegende Nadel entfernt. Unter mehrfachem Vorschieben und Zurückziehen der Kanüle im Lebergewebe (5 bis 6 Mal), ohne dass die Kanüle dabei ganz aus der Leber herausgezogen wurde, erfolgte die Entnahme des Lebergewebes. Beim vollständigen Herausziehen der Punktionskanüle aus dem Tierkörper musste auf den Verschluss der Kanüle durch den Finger geachtet werden, um einem Biopatverlust durch Luftestrom über die Punktionskanüle vorzubeugen.

3.2.3.3 Kupfersulfat-Test

Das Leberpunktat wurde in genau spezifizierten Kupfersulfatlösungen absteigender Dichte (1080 – 1010 mg/ml) bzw. Wasser (1000 mg/ml) eingebracht, um durch Beobachtung von Flotation und Sedimentation den Leberfettgehalt abschätzen zu können.

Die Beziehungen zwischen der spezifischen Dichte und dem Leberfettgehalt in Prozent zeigt die Tabelle 6.

Tabelle 6: Die Beziehung zwischen der spezifischen Dichte und dem Leberfettgehalt.

Spezifische Dichte mg/ml	Beobachtung	Leberfettgehalt %
1000	Flotation	>33
	Sedimentation	33->29,5
1010	Flotation	>29,5
	Sedimentation	29,5->26
1020	Flotation	>26
	Sedimentation	26->22,5
1030	Flotation	>22,5
	Sedimentation	22,5->19
1040	Flotation	>19
	Sedimentation	19->15,5
1050	Flotation	>15,5
	Sedimentation	15,5->12
1060	Flotation	>12
	Sedimentation	12->8,5
1070	Flotation	>8,5
	Sedimentation	8,5->5
1080	Flotation	>5
	Sedimentation	5->1,5

3.2.4 Statistische Auswertung

Die Erfassung und statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Datenverarbeitungsprogramm Excel 2000 unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS Version 11.0. Die Daten wurden anhand des KOLMOGOROV-SMIRNOV-Tests auf Normalverteilung überprüft. Zur Beschreibung der Untersuchungsgruppen wurden die statistischen Maßzahlen arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung, Median, Minimum, Maximum, erstes Quartil und drittes Quartil bestimmt. Da bei keinem Parameter eine Normalverteilung gefunden wurde, wurden für die weitere Analyse nichtparametrische Tests verwendet. Die Medianwerte wurden bei unverbundenen Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test, bei verbundenen Stichproben mit dem Wilcoxon-Test verglichen. Zur Überprüfung der Hypothese, daß zwei nominalskalierte Variablen voneinander unabhängig sind, wurde Pearson's Chi Quadrat-Test eingesetzt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.