

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

In die Auswertungen dieser Arbeit wurden insgesamt $n = 331$ Hunde verschiedener Herkunft einbezogen. Das mittlere Alter betrug 7 (3,0 - 9,1) Jahre. Von den Tieren waren $n = 169$ (51,1 %) männlichen und $n = 162$ (48,9 %) weiblichen Geschlechts. Davon stammten $n = 207$ Hunde aus den Untersuchungen des VetMed Labors in Ludwigsburg. Außerdem wurden für die Untersuchungen der Kreatininverteilung in den Körperkompartimenten $n = 31$ Hunde aus der Medizinischen Tierklinik der LMU München herangezogen. Schließlich erfolgte die Bestimmung unterschiedlicher renaler Funktionsdaten an $n = 93$ Hunden (Tab. 8). Diese Tiere werden im Folgenden näher beschrieben.

Tab. 8: Herkunft der untersuchten Hunde ($n = 93$)

Herkunft der Hunde	Anzahl (n)	relativer Anteil (%)
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FU Berlin	11	11,8
Institut für Parasitologie und Tropenmedizin der FU Berlin	10	10,8
Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin	11	11,8
Tierarztpraxis Dr. U. Küchenmeister	8	8,6
Kleintierpraxis Dr. B. Sörensen	8	8,6
Tierarztpraxis Dr. Th. Göbel	6	6,5
Kleintierklinik Potsdam	6	6,5
sonstige	33	35,4
gesamt	93	100

Unter „sonstige“ sind die Hunde zusammengefasst, bei denen aus Interesse des Tierbesitzers die renale Funktionsdiagnostik zur Anwendung kam.

Die 93 untersuchten Hunde gehörten 23 verschiedenen Rassen an oder waren Mischlinge. Bei der Rassenverteilung fiel auf, dass am häufigsten Mischlinge, gefolgt von den Beaglen, vertreten waren. Als häufig vorkommende Rassen sind der Berner-Sennen-Hund mit $n = 7$ Tieren und der Labrador Retriever mit $n = 6$ Tieren zu nennen. Von den übrigen aufgeführten Rassen wurden jeweils 1 - 3 Tiere untersucht.

In der nachstehenden Tabelle 9 wurden die Hunde, nach ihrer Rasse gegliedert, aufgelistet.

Tab. 9: Rasseverteilung der 93 untersuchten Hunde

Rasse	Anzahl (n)	relativer Anteil (%)
Mischling	29	31,1
Beagle (Versuchstiere)	21	22,5
Berner-Sennen-Hund	7	7,4
Labrador Retriever	6	6,4
Irish Red Setter	3	3,1
Deutsch Drahthaar	3	3,1
Boxer	2	2,2
Deutsch Kurzhaar	2	2,2
DSH	2	2,2
Kromfohrländer	2	2,2
Magyar Vizsla	2	2,2
Hovawart	1	1,1
Griffon	1	1,1

Rasse	Anzahl (n)	relativer Anteil (%)
Golden Retriever	1	1,1
Foxterrier	1	1,1
Malteser	1	1,1
Welsh Terrier	1	1,1
Münsterländer	1	1,1
Yorkshire Terrier	1	1,1
Whippet	1	1,1
Afghane	1	1,1
Leonberger	1	1,1
Collie	1	1,1
Dobermann	1	1,1
Shar Pei	1	1,1
gesamt	93	100

Die Körpermasse der Tiere betrug zwischen 2,5 und 80 kg. Der Median (1. - 3. Quartil) lag bei 22 (13,6 - 33,0) kg.

Das Alter der Tiere betrug 5 (2,0 - 8,0) Jahre. Die jüngsten Tiere waren 0,5 und die ältesten 12,5 Jahre.

Insgesamt $n = 47$ der untersuchten Hunde waren männlich, davon $n = 16$ Tiere (34,0 % aller Rüden) kastriert. Es wurden insgesamt $n = 46$ Hündinnen untersucht, davon $n = 24$ kastrierte Tiere (53,3 % aller Hündinnen) (Tab. 10). Die Klassifikation der in die Untersuchungen aufgenommenen Hunde erfolgte in 5 Altersklassen. Sie sind zusammen mit der Geschlechtsverteilung in der Tabelle 10 dargestellt.

Tab. 10: Alters- und Geschlechtsverteilung der untersuchten Hunde

		Anzahl (n)	relativer Anteil (%)
Geschlecht	männlich	31	33,3
	männlich kastriert	16	17,2
	weiblich	22	23,7
	weiblich kastriert	24	25,8
	gesamt	93	100,0
	Alter (Jahre)	< 2	15
2-6		36	38,7
6-8		16	17,2
8-10		11	11,9
> 10		15	16,1
gesamt		93	100,0

3.2 Durchführung der renalen Funktionsdiagnostik

3.2.1 Markersubstanz und Dosierung

Zum Einsatz gelangte eine 5% - ige (5g/100ml) Kreatininlösung. Sie wurde hergestellt, indem mittels einer sterilen Einmalkanüle (Supra Einmalkanülen, Größe 2,00 x 60mm, Fa, Ehrhardt-Söhne GmbH) 5 g Kreatinin (Artikel-Nr.: 701225-0002, 100 mg Kreatinin zur Kreatininbestimmung im Blut, Hersteller: Fa. Merck, bezogen über Fa. Synopharm) in eine 100 ml Flasche *Aqua ad inj.* (Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg) eingebracht wurden.

Für die Bestimmung der P-CL mit exogenem Kreatinin wurde je Tier der Marker Kreatinin in der Dosierung von 2 g je m² Körperoberfläche (KOF) intravenös oder subkutan verabreicht. Die KOF berechnet sich nach der Meeh'-Formel aus der Lebendmasse (LM) in kg und dem Koeffizienten $k_{\text{Kleintier}}$.

$$\text{KOF (m}^2\text{)} = \text{LM (kg)}^{0,667} \cdot k \quad (7)$$

$$k_{\text{Kleintier}} = 0,1$$

3.2.1 Versuchsdurchführung

Die Durchführung der modifizierten P-CL von exogenem Kreatinin ist in der Tabelle 11 dargestellt.

Tab. 11: Durchführung der renalen Funktionsdiagnostik

Ablauf	Zeit (Stunden) p. appl.	Testdurchführung
Patienten- vorbereitung		- Nahrungskarenz über mindestens 6 h - Trinkwasser ad libitum (auch während der Testdurchführung)
Funktionstest	0	- Entnahme der Probe 0 (=Ausgangswert) - Kreatiningabe i.v. (s.c. bei wehrhaften Tieren) - genaue Zeitmessung erforderlich
	2-3	- Entnahme der 1. Blutprobe
	3-4	- Entnahme der 2. Blutprobe
	4	- Entnahme von weiteren 3 Blutproben (Probe 3, 4 und 5) - der Zeitabstand zwischen den einzelnen Proben beträgt mindestens 1 Stunde
	8	- späteste Entnahme der letzten Blutprobe (Probe 5)

Vor Untersuchungsbeginn wurde von jedem Hund eine Urinprobe (Spontanurin) aufgefangen und die Lebendmasse mit einer Tierwaage ermittelt. Nach klinischer Allgemeinuntersuchung (Körperhaltung, Verhalten, Schleimhäute, kapilläre Füllungszeit) konnte mit der diagnostischen Untersuchung begonnen werden.

Am Vorderbein wurde zunächst an einer Stelle von 1 x 1 cm auf der Vena cephalica antebrachii das Fell geschoren, die entsprechende Hautstelle desinfiziert und ein Stauschlauch über dem Ellenbogengelenk angelegt. Nach Einbringen eines Venenverweilkatheters (Vasocan Braunüle 20 G 1 1/4 oder 22 G 1, Fa. Braun) in die Vena cephalica antebrachii wurde dieser mit Leukosilk-Klebestreifen an der Haut des Vorderbeins fixiert. Aus dem Venenverweilkatheter konnte die erste Blutprobe (0 - Probe) entnommen werden (s. Tab. 11). Es wurden ca. 1 ml Blut in ein mit EDTA beschichtetes Röhrchen (Probengefäß 1,3 ml, 1,6 mg EDTA/ml Blut, Fa. Sarstedt) und ca. 4,5 ml in ein Röhrchen (Serum-Proberöhrchen, Röhrchen mit Granulat, 5 ml, Fa. Sarstedt) zur Serumgewinnung gefüllt. Danach erfolgte die intravenöse Applikation der 5 % - igen Kreatininlösung in der Dosierung von 2 g je m² KOF. Anschließend wurde der Venenverweilkatheter wieder entfernt und dem Tier ein Druckverband zur Blutstillung angelegt. Bei sehr wehrhaften Tieren oder

bei Verschluss der Venenverweilkanüle nach Entnahme der Blutprobe geschah die Applikation der Kreatininlösung subkutan.

Die nächste Blutprobe wurde im Zeitraum 2 - 3 Stunden nach Applikation der Kreatininlösung entnommen (s. Tab. 11). Nach Rasur, Desinfektion und Stauung über dem Ellenbogengelenk des anderen Vorderbeins erfolgte die Punktion der Vena cephalica antebrachii mit einer Kanüle (BD Microlance 3, 20 G x 1 ½ - Nr. 1). Auf diese Weise wurden ca. 2 ml Blut zur Serumgewinnung entnommen und nach der Punktion ein Druckverband zur Blutstillung angelegt.

Weiterhin wurden jeweils im Abstand von mindestens 1 Stunde weitere 4 Blutproben zur Serumgewinnung nach dem beschriebenen Verfahren entnommen (Tab. 11).

3.2.2 Berechnung der terminalen Plasma-Clearance (P-CL_{terminal})

Bei allen Hunden wurde die GFR mit dem Verfahren der terminalen Plasma-Clearance (P-CL_{terminal}) von exogenem zugeführtem Kreatinin ermittelt. Genutzt wurden dazu die Blutproben 3, 4, und 5. Mit den Blutproben 1 und 2 wurde die Vereinfachung des Tests untersucht. Es sollten beide Zeiträume (2 - 3 und 3 - 4 Stunden p. appl.) auf ihre diagnostische Aussagekraft im Hinblick auf die GFR des Tieres untersucht werden. Die quantitative Funktionsdiagnostik erfolgte mittels eines eigens für diesen Zweck hergestellten Computerprogramms (Höchel et al., 2004). Mit Hilfe dieses Programms konnte die GFR über die Berechnung der Steigung β einer Geraden kalkuliert werden. Diese Gerade bildeten die Serum-[Kreatinin_{exo}] der drei entnommenen Blutproben nach Markerzuführung. Die GFR wurde in % der Norm angegeben. Höchel et al. (2004) entwickelten diesen renalen Funktionstest und bestimmten die Referenzdaten der GFR für klinisch gesunde Hunde. Sie wurden für die Bewertung der GFR-Befunde für die untersuchten Tiere zu Grunde gelegt. Die sachgemäße Durchführung eines jeden Funktionstests wurde mit dem Bestimmtheitsmaß (R^2) überprüft. Das R^2 gibt die Genauigkeit an, mit der die drei nach Markerapplikation ermittelten Werte der Serum-[Kreatinin_{exo}] auf einer Geraden liegen. Da der terminale Abschnitt der Konzentrations - Zeitkurve des exogen zugeführten Kreatinins nur noch von einer Variablen (renale Elimination) abhängig ist, verläuft dieser Teil der Eliminationskurve monoexponentiell. Die exogenen Serumkreatininwerte der Ausscheidungskurve liegen daher bei semilogarithmischer Darstellung auf einer Geraden. Das Bestimmtheitsmaß musste für jeden durchgeführten Test einen Wert von $\geq 0,98$ aufweisen. Ansonsten wurde der Test als unzureichend valide eingestuft und gelangte nicht zur Auswertung.

3.3 Labormethoden

3.3.1 Aufbereitung der Blutproben

Zur Herstellung von Serum wurden die Probenröhrchen jeweils 10 Minuten in der Labofuge 400 (Précision, Fa. Haereus) zentrifugiert (relative Zentrifugalbeschleunigung 13624 x g), das gewonnene Serum in Probenröhrchen (Probenröhrchen neutral, 10 ml, Fa. Kabe) portioniert und für weitere Bestimmungen bei -20° C aufgehoben.

3.3.2 Kreatinin-Bestimmung in Serum und Harn

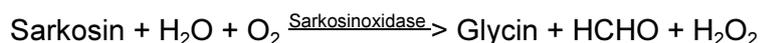
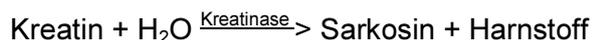
3.3.2.1 Bestimmungsmethoden

Das Serumkreatinin wurde mittels eines kinetischen Farbttests nach der Jaffé-Methode (Roche Hitachi, Fa. Roche GmbH, Mannheim) bestimmt¹.

Die Jaffé-Methode beruht auf einer gepufferten kinetischen Reaktion ohne Deproteinisierung. In alkalischer Lösung reagiert Kreatinin mit Pikrat und bildet einen gelbroten Komplex (Foster-Swanson *et al.*, 1994).

Die Bildungsgeschwindigkeit des Farbstoffes (Farbintensität) ist direkt proportional zur Kreatininkonzentration in der Probe. Sie wird durch Messung der Extinktionszunahme bei 512 nm bestimmt. Serum- und Plasmaproben enthalten u. a. Proteine, die bei der Jaffé-Methode unspezifisch mitreagieren. Zur Korrektur des unspezifischen Proteineinflusses wurden deshalb von den ermittelten Kreatininwerten jeweils 0,3 mg/dl (26,5 µmol/l) abgezogen.

Zur Bestimmung der Serum-Kreatininkonzentration mittels enzymatischer Methode existieren zwei verschiedene Enzyme. Es kann die Kreatininase (= Kreatinin - Aminohydrolase) oder die Kreatinin-Deiminase (Kreatinin - Iminohydrolase) genutzt werden (Braun *et al.*, 2003). Die enzymatische Methode, die für die Wiederauffindungsrate von Kreatinin im Hundeserum in Kap. 4.1. genutzt wurde, beruht auf der enzymatischen Reaktion der Kreatininase. Diese Reaktion verläuft folgendermaßen:



TBHB = 2,4,6-Tribrom-3-Hydroxybenzoesäure

¹ Die Untersuchung erfolgte im Institut für Veterinärmedizinische Diagnostik (IVD) Berlin. Für die gewissenhafte Laboranalytik bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des IVD, besonders bei TÄ Eva Radtke.

Die Entstehung des Farbstoffs wird photometrisch gemessen. Mit dieser Methode erfolgte die Bestimmung der Serumkreatininkonzentration ohne Einflussnahme der Serum - Proteine.

3.3.3 Weitere Blutparameter

Zur Erfassung des Gesundheitszustandes aller Hunde wurden die EDTA- und Serumproben mit den in der Tabelle 12 aufgeführten Methoden und Geräten untersucht.

Tab. 12: Untersuchungsparameter und Bestimmungsmethoden im Serum/EDTA-Blut (Referenzbereiche nach Kraft und Dürr, 2004)

Parameter im Blut	Methode	Gerät	VK (%)	Referenzbereich
Leukozyten	Optische Messung	Cell-Dyn 3500 (Fa. Abbott)	2,8	6 - 12 x 10 ⁹ /l
Erythrozyten	Widerstandsmessung		1,9	5,5 - 8,5 x 10 ¹² /l
Thrombozyten	Widerstandsmessung		1,8	150 - 500 x 10 ⁹ /l
Hämatokrit	Berechnung		2,1	0,4 - 0,55 l/l
Hämoglobin	Spektrophotometrie		1,3	8,2 - 11,8 mmol/l
MCV	Berechnung			60 - 77 fl
MCH				1,3 - 1,7 fmol
MCHC				20 - 22 mmol/l
Kreatinin	kinetischer Farbttest (Jaffé)	Roche Hitachi Modular, Fa.Roche Diagnostics	2,59	35 - 106 µmol/l
Chlorid	indirekte ionenselektive Messung		2,39	96 - 113 mmol/l
Natrium	indirekte ionenselektive Messung		1,26	140 - 155 mmol/l
Kalium	indirekte ionenselektive Messung		1,77	3,5-5,1 mmol/l
Kalzium	Kresolphtalein-Komplex		2,25	2,3 - 3,0 mmol/l
Harnstoff	Urease-GLDH-Methode		2,41	3,3 - 8,3 mmol/l
Magnesium	Flammenatomabsorptions-spektrometrie		2,58	0,6 - 1,3 mmol/l
Phosphat	Ammoniummolybdat-Komplex		2,72	0,7 - 1,6 mmol/l

3.3.4 Harnuntersuchung

Zur weiteren Beurteilung des Gesundheitszustandes der untersuchten Hunde wurde zusätzlich eine Harnuntersuchung durchgeführt. Dabei wurden die in den Tabellen 13 und 14 dargestellten Parameter mit den aufgeführten Methoden und Geräten untersucht.

Tab. 13: Untersuchungsparameter und Bestimmungsmethoden im Harn (Referenzbereiche nach Kraft und Dürr, 2004)

Parameter im Harn	Methode	Gerät	VK (%)
Kalium	indirekte ionenselektive Messung	Roche Hitachi	3,2
Natrium	indirekte ionenselektive Messung		2,53
Phosphat	Ammoniummolybdat Komplex		2,51
Kalzium	Kresolphthalein Komplex		4,24
Chlorid	indirekte ionenselektive Messung		
Harnstoff	Urease-GLDH-Methode		2,42
Protein	Benzethonium-Methode		7,53
Kreatinin	kinetischer Farbttest nach Jaffé		1,92
Osmolalität	Gefrierpunktserniedrigung	Osmometer	1,3
Dichte		Refraktometer	

Tab. 14: Parameter und Quotienten zur Bestimmung des Harnstatus (aus Kraft und Dürr, 2004)

Parameter	Referenzbereich
Dichte (g/l)	1.001 - 1.065
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	
Gesamtprotein (mg/dl)	6 - 53
Urin-Protein/Kreatinin (U-P/C)	bis 0,5
¹ FE _{Na} (%)	0,0 - 0,7
¹ FE _K (%)	3,0 - 39,0
¹ FE _{Phosphat} (%)	0,0 - 20,0

¹ Die renale fraktionelle Elektrolytausscheidung (FE) über die Nieren berechnet sich:

$$FE_x (\%) = ([X]_{\text{Harn}}/[X]_{\text{Plasma}}) \cdot ([\text{Kreatinin}]_{\text{Plasma}}/[\text{Kreatinin}]_{\text{Harn}}) \cdot 100. \quad (8)$$

3.4 Datenauswertung

3.4.1 Ermittlung eines Grenzwertes (Cut-off-value) für die Serum-[Kreatinin_{endo}]

Für die Ermittlung eines geeigneten Grenzwertes (Cut-off value) der Serum-[Kreatinin_{endo}] gelangte das statistische Verfahren der ROC-Analyse (Receiver Operating Characteristic)² zur Anwendung. In die Untersuchungen wurden zusätzlich n = 212 Hunde aus dem Patientengut des VetMed Labors in Ludwigsburg einbezogen. Die in diesem Abschnitt zusätzlich untersuchten Hunde stammten aus tierärztlichen Praxen/Kliniken Deutschlands, Österreichs, der Schweiz und den Niederlanden. Zum Zweck der quantitativen GFR-Bestimmung wurden die Blutproben der untersuchten Hunde an das Labor eingesandt. Unter den untersuchten Tieren befanden sich sowohl klinisch gesunde als auch nierenkranke Hunde. Die Untersuchungsbedingungen zur Ermittlung des renalen Funktionstests waren für alle Hunde einheitlich.

Mit ROC-Kurven kann das Zusammenwirken von Sensitivität und Spezifität eines diagnostischen Tests analysiert werden (Bühl und Zöfel, 2002; Guggenmoos-Holzmann und Wernecke, 1995). Die diagnostische Anwendung der Testergebnisse beruht auf der Theorie des prädiktiven Wertes eines Laborbefundes. Über die AUC kann die diagnostische Sicherheit eines Tests bewertet werden (Greiner *et al.*, 2000). Das Verfahren der ROC-Analytik kam ebenfalls bei der Untersuchung des „Zwei-Schritt-Verfahrens“ zur Anwendung.

3.4.2 Statistische Auswertung

Alle erhaltenen Werte wurden zunächst in einer Excel Tabelle (Microsoft Excel 2000) zusammengefasst. Mit Hilfe des SPSS-Programms (Version 12.0 für Windows) konnten die Daten zueinander in Beziehung gesetzt werden. Die Ergebnisse werden als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) ($\bar{x} \pm s$) oder als Median (MD) (1. - 3. Quartil) angegeben.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Balken- oder Liniendiagramm sowie in Form der in Abbildung 4 dargestellten „Box-and-Whisker-Plots“ (kurz: Boxplots).

² Für die tatkräftige Hilfe bei der statistischen Auswertung bedanke ich mich sehr bei dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung, besonders bei Frau Dipl.-Statistikerin R. Schmitz.

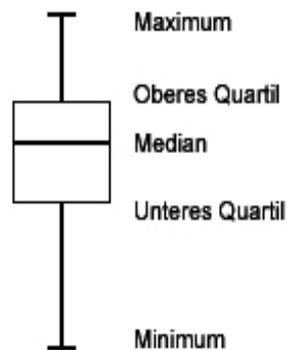


Abb. 4: Schematische Darstellung eines Boxplot

Die Boxplots bestehen aus Rechtecken, die 50 % der Werte zwischen dem 1. (unteren) und dem 3. (oberen) Quartil enthalten und zwei Extensionslinien, welche die Minimal- und Maximalwerte darstellen. Der Median ist durch einen horizontalen Balken innerhalb des Rechtecks angegeben. Ausreißer sind Werte, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt sind. Sie werden mit einem Kreis dargestellt. Extremwerte sind mehr als drei Boxenlängen vom oberen oder unteren Rand der Box entfernt und werden durch ein Sternchen gekennzeichnet. Durch diese Darstellung kann man Rückschlüsse auf eine symmetrische oder asymmetrische Verteilung der Werte ziehen. Eine asymmetrische Verteilung liegt vor, wenn das 1. und 3. Quartil unterschiedliche Abstände zum Median aufweisen.