

3. Material und Methoden

3.1 Methodische Untersuchungen

3.1.1 Vergleich der Ergebnisse von fraktionierter und einfacher NSBA

Da die einfache NSBA in der Bestimmung weitgehend unabhängig vom pH-Wert und mit der Titration auf Farbumschlag des zugesetzten Indikators ein eher subjektives Verfahren darstellt, sollte untersucht werden, ob beide Varianten der NSBA-Bestimmung, also einfache und fraktionierte NSBA, die gleichen Ergebnisse liefern. Hierzu wurden aus den gleichen Harnproben sowohl die einfache als auch die fraktionierte NSBA bestimmt.

3.1.2 Haltbarkeit der Harnproben bei Kühlschranktemperatur

Da unter Praxisbedingungen die entnommenen Harnproben in der Regel nicht am gleichen Tag zur Untersuchung ins Labor transportiert werden können, ist es wichtig zu wissen, über welchen Zeitraum die Proben bei Kühlschranktemperatur gelagert werden können. Bislang galten fünf Tage als ein vertretbarer Zeitraum.

Bei dem durchgeführten Verfahren wurden die Poolproben am Entnahmetag nach Ankunft in der Klinik für Kleintiere im Kühlschrank bei 4 bis 8°C gelagert. Die Bestimmung der fraktionierten NSBA erfolgte an Tag 1, Tag 4 und Tag 7 nach der Entnahme. Dabei wurden die Proben lediglich für den Zeitraum der Entnahme von 10 ml außerhalb des Kühlschranks aufbewahrt und danach sofort wieder in diesen zurück verbracht, so dass sich die Proben maximal 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur befanden.

3.1.3 Untersuchung der Harnsedimente

Werden die Harnproben bei -20°C tiefgefroren, entsteht ein deutlich sichtbarer Bodensatz. Um der Frage nachzugehen, woraus sich dieses Sediment zusammensetzt, wurden ca. 6 ml der Poolproben in 10 ml-Probengefäßen (Fa. Sarstedt) über einen Zeitraum von 3 bis 5 Tagen bei -18°C tiefgefroren. Nach diesem Zeitraum wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut und bei 4000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Sediment mit 1 bis 2 Tropfen des restlichen Harnes aufgeschwemmt. Ein Tropfen der Sedimentlösung wurde auf einen Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas abgedeckt und bei 40facher Vergrößerung unter dem Mikroskop durchgemustert. Es erfolgte eine qualitative Beschreibung der gefundenen Bestandteile und eine semiquantitative Registrierung nach Tab. 20.

Tab. 20: Semiquantitative Beurteilung der Sedimente der tiefgefrorenen Harnproben

Beurteilung	Beschreibung
+	geringe Menge (1-4/Sichtfeld)
++	mittlere Menge (5-10/Sichtfeld)
+++	große Menge (>10/Sichtfeld)

3.1.4 Bestimmung der NSBA mit und ohne Sediment in der Harnprobe

Aufgrund der Bestandteile der Harnsedimente stellte sich die Frage, ob und in welchem Maße das beim Tieffrieren der Harnproben entstehende Sediment die Bestimmung der NSBA beeinflusst. Hierzu wurde aus den Harnproben erst mit Hilfe einer Glaspipette 10 ml aus dem Sedimentfreien Überstand abpipettiert. Danach wurde die Probe geschwenkt und diesmal 10 ml inklusive des aufgeschwemmten Bodensatzes entnommen. Aus jeweils beiden Proben wurde dann zum gleichen Zeitpunkt die fraktionierte NSBA bestimmt.

3.1.5 Einfluss der unterschiedlichen Füllhöhe der Probengefäße auf pH-Wert und NSBA

Bei der Probenentnahme im Stall wurden pro Kuh 2 Probengefäße gefüllt, eines fast vollständig, das andere zu ca. einem Viertel. Die Proben wurden unter gleichen Bedingungen gelagert, und aus den sich entsprechenden Proben zum selben Zeitpunkt der pH-Wert gemessen bzw. die einfache NSBA bestimmt.

3.1.6 Vergleich von Poolproben mit den Mittelwerten der entsprechenden Einzelproben

Bei Poolproben, deren Parameter von den Referenzbereichen abwichen, wurden die entsprechenden Einzelproben am gleichen Tag wie die Poolproben untersucht. Die bestimmten Parameter können Tab. 25 entnommen werden. Für die jeweils bestimmten Parameter der Einzelproben wurden die Mittelwerte gebildet und mit den Werten der Poolproben verglichen.

3.2 Bestandsuntersuchungen

3.2.1 Allgemeines

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum von November 1999 bis April 2001 im Rahmen einer kontinuierlichen Bestandsbetreuung in acht Betrieben in Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern und Sachsen-Anhalt durchgeführt. Einer Betriebe bestand zu Beginn der Untersuchungen aus drei einzelnen Betriebsteilen, so dass zeitweilig zehn Einzelbetriebe besucht wurden. Von diesen drei Betriebsteilen wurde im September 2000 eine Anlage geschlossen, womit sich die Anzahl der betreuten Betriebe auf neun reduzierte. Jeder Betrieb wurde im Abstand von vier bis sechs Wochen besucht. Die Betriebsgröße variierte von ca. 150 bis 1200 Kühen pro Betrieb und lag im Mittel bei 650 Kühen. Bei den aufgestellten Rindern handelte es sich überwiegend um Tiere der Rasse „Deutsche Schwarzbunte“ mit einem maximalen Anteil an „Schwarzbuntem Milchrind“ (SMR) von 25%. Die Aufstallung erfolgte in Boxenlaufställen auf Spaltenböden. Die Futtrationen wurden in Form einer totalen Mischration (TMR) zugeteilt und je nach Betrieb drei bis sechs mal pro Tag über Mischwagen oder Futterbänder angeboten. Die Zusammensetzung der verschiedenen Futtrationen kann Tab. 51 des Anhangs entnommen werden.

3.2.2 Auswahl der Tiere

Auf jedem der acht Betriebe erfolgte in Abhängigkeit des Laktationszeitpunktes eine Einteilung der Tiere in fünf Gruppen (Tab. 21).

Tab. 21: Einteilung der Gruppen nach Laktationszeitpunkt

Gruppe	Bezeichnung	Laktationszeitpunkt
1	Trockensteher	bis 3 Wochen ante partum
2	Vorbereiter	3 bis 0 Wochen ante partum
3	Frischabgekalbte	0 bis 1 Woche post partum
4	Frühlaktation	3 bis 5 Wochen post partum
5	Ende der Frühlaktation	15 bis 18 Wochen post partum

Aus diesen fünf Gruppen wurden je zehn klinisch gesund erscheinende Tiere zufällig ausgewählt. In einem Betrieb, der anfangs aus drei Betriebsteilen bestand, wurden pro Gruppe nur fünf Tiere ausgewählt. Diese Anzahl wurde auch beibehalten, nachdem einer der Betriebsteile im September 2000 geschlossen wurde. Bei den nicht laktierenden Tieren wurde darauf geachtet, dass es sich nicht um Färsen, sondern um Tiere handelte, die bereits einmal abgekalbt hatten.

In jedem Betrieb erfolgte eine Kontrolle der Futterrationen auf die Verabreichung von sauren Salzen oder des Pansenpuffers Natriumbikarbonat. In Abhängigkeit dieser Zusätze erfolgte dann eine weitere Unterteilung der obengenannten Gruppen, so dass insgesamt neun Einzelgruppen entstanden. Die Zusammensetzung der neun Einzelgruppen kann Tab. 22 entnommen werden. Tab. 23 enthält die Anzahl der untersuchten Proben in den jeweiligen Gruppen.

Tab. 22: Einteilung der Gruppen nach Laktationszeitpunkt und Zusatz von sauren Salzen und Natriumbikarbonat

Gruppe	Bezeichnung	Laktationszeitpunkt	saure Salze	Natriumbikarbonat
1	Trockensteher	bis 3 Wochen a.p.	nein	nein
2	Vorbereiter	3 bis 0 Wochen a.p.	<i>ja</i>	nein
3	Frischabgekalbte	0 bis 1 Woche p.p.	nein	<i>ja</i>
4	Frühlaktation	3 bis 5 Wochen p.p.	nein	<i>ja</i>
5	Ende der Frühlaktation	15 bis 18 Wochen p.p.	nein	<i>ja</i>
6	Vorbereiter	3 bis 0 Wochen a.p.	nein	nein
7	Frischabgekalbte	0 bis 1 Woche p.p.	nein	nein
8	Frühlaktation	3 bis 5 Wochen p.p.	nein	nein
9	Ende der Frühlaktation	15 bis 18 Wochen p.p.	nein	nein

Tab. 23: Anzahl der Proben in den Gruppen der jeweiligen Laktationszeitpunkte

Gruppe	Bezeichnung	Laktationszeitpunkt	Anzahl der Proben
1	Trockensteher	bis 3 Wochen a.p.	146
2	Vorbereiter	3 bis 0 Wochen a.p.	117
3	Frischabgekalbte	0 bis 1 Woche p.p.	134
4	Frühlaktation	3 bis 5 Wochen p.p.	135
5	Ende der Frühlaktation	15 bis 18 Wochen p.p.	134
6	Vorbereiter	3 bis 0 Wochen a.p.	40
7	Frischabgekalbte	0 bis 1 Woche p.p.	13
8	Frühlaktation	3 bis 5 Wochen p.p.	13
9	Ende der Frühlaktation	15 bis 18 Wochen p.p.	13

3.2.3 Probenentnahme

Die ausgewählten Tiere wurden in den Liegeboxen, Fressfanggitter, Zwangsständen oder Treibgängen fixiert. Nach gründlicher Reinigung der Scham und ihrer Umgebung mit warmem Wasser, dem ein Reinigungs- bzw. ein Desinfektionsmittel zugesetzt war, erfolgte unter digitaler Kontrolle die Harnentnahme mit Hilfe eines Uteruskatheters nach BRESSLAU. Nach Verwerfen des Anfangsharnes wurde der Harn in 100 ml-Versandgefäße (Fa. Sarstedt) aufgefangen.

3.2.4 Probenaufbereitung

Der Transport der Harnproben erfolgte bei Umgebungstemperatur. Aus den jeweils fünf bzw. zehn Einzelproben einer Gruppe wurden jeweils 6 ml entnommen und je Gruppe eine Mischprobe, die im weiteren als Poolprobe bezeichnet wird, hergestellt (Abb. 8).

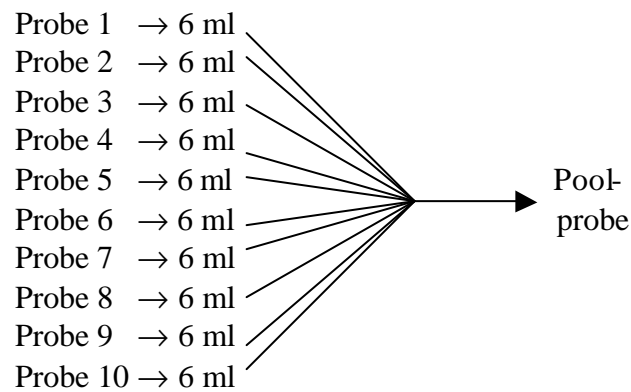


Abb. 8: Herstellen der Poolproben aus den Einzelproben (am Beispiel von 10 Einzelproben)

Sowohl Einzel- als auch Poolproben wurden im Kühlschrank bei 4 bis 8°C gelagert, sofern die Untersuchung am nächsten Tag gewährleistet war. War dies nicht der Fall, wurden alle Proben bei -20°C bis zur Untersuchung tiefgekühlt.

3.2.5 Laboranalytische Untersuchungen

Die Bestimmung aller Parameter in den Harnproben erfolgte im Labor der Klinik für Kleintiere an der Freien Universität Berlin. Zur Untersuchung gelangten in erster Linie die hergestellten Poolproben. Wurden Abweichungen von den Referenzwerten (Tab. 24) festgestellt, erfolgte eine Untersuchung der entsprechenden Einzelproben am gleichen Tag. Generell wurde in allen Einzelproben der pH-Wert gemessen. Eine Übersicht über die jeweils bestimmten Parameter enthält Tab. 25.

Tab. 24: Referenzwerte der in den Harnproben bestimmten Parameter

Parameter	Referenzbereich	Einheit
pH	7,8 – 8,4	
NSBA	107 – 193	mmol/l
Basen	150 – 250	mmol/l
Säuren	50 – 100	mmol/l
NH₄⁺	< 10	mmol/l
BSQ	2,5 – 4,8	
Magnesium	3,7 – 16,5	mmol/l
Natrium	> 8,7	mmol/l
Kalium	140 – 320	mmol/l
Chlorid	40 – 160	mmol/l
Calcium	< 1,5	mmol/l
Phosphor	< 5,7	mmol/l
Kreatinin	10000	μmol/l

Tab. 25: Aus den jeweiligen Proben bestimmte Parameter

	Poolproben	Einzelproben	
		generell	zusätzlich
Säure-Basen-Haushalt	pH fraktionierte NSBA	pH	einfache NSBA
Mengenelemente	Calcium Phosphor Magnesium Natrium Kalium Chlorid		Calcium Magnesium Natrium Kalium Chlorid
Sonstiges	Kreatinin		

Die Analysemethoden der Parameter sind Tab. 26 zu entnehmen.

Tab. 26: Analysemethoden der Parameter

	Parameter	Analysemethode
Säure-Basen-Haushalt	pH	pH-Meter, Microprocessor pH-Meter WTW
	NSBA	Titration nach KUTAS (1965)
Mengenelemente	Calcium	AAS ¹⁾
	Phosphor	Molybdat-Reaktion ²⁾
	Magnesium	AAS ¹⁾
	Natrium	AAS ¹⁾
	Kalium	AAS ¹⁾
	Chlorid	Potentiometrie ³⁾
Sonstiges	Kreatinin	Jaffé ²⁾

¹⁾ Atomabsorptionsspektrometrie (PU 9200 atomic absorption spectrophotometer, Philips)

²⁾ Hitachi 704 Automatic Analyzer

³⁾ Synchron EL-ISE Elektrolyte Sys., Beckman

3.2.5.1 Bestimmung der NSBA

Die Bestimmung der NSBA erfolgte nach der Titrationsmethode nach KUTAS (1965). In den Poolproben wurde generell die fraktionierte, in den Einzelproben die einfache NSBA bestimmt. Die Arbeitsschritte können der Übersicht in Tab. 27 entnommen werden.

Tab. 27: Durchführung der einfachen und der fraktionierten NSBA

Einfache NSBA	Fraktionierte NSBA
<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml Harn schütteln und mit 1 n HCl auf pH ≤ 4 titrieren • 30 Sekunden kochen • abkühlen • 10 ml 20 % Formaldehydlösung und 5 Tropfen Phenolrot • mit 0,1 n NaOH bis zum Farbumschlag von gelb nach rot titrieren 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 ml Harn schütteln und mit 1 n HCl auf pH 3,5 titrieren • 30 Sekunden kochen • abkühlen • mit 0,1 n NaOH auf pH 7,4 titrieren • 10 ml 20 % Formaldehydlösung zugeben • mit 0,1 n NaOH auf pH 7,4 titrieren
$\text{NSBA (mmol/l)} = [(V_{\text{HCl}} \times 10) - V_{\text{NaOH}}] \times 10$	$\text{Basen (mmol/l)} = V_{\text{HCl}} \times 100$ $\text{Säuren (mmol/l)} = V_{\text{NaOH1}} \times 10$ $\text{NH}_4 \text{ (mmol/l)} = V_{\text{NaOH2}} \times 10$ $\text{BSQ} = \text{Basen} : \text{Säuren}$ $\text{NSBA (mmol/l)} = [(V_{\text{HCl}} \times 10) - (V_{\text{NaOH1}} + V_{\text{NaOH2}})] \times 10$

3.3 Statistische Methoden

Die Erfassung und statistische Auswertung der Werte erfolgten unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms SPSS Version 10.0.7. Das Signifikanzniveau war auf $\alpha = 5\%$ eingestellt. Auf der Grundlage des Zentralen Grenzwertsatzes wurden parametrische Tests zur Auswertung herangezogen. Die Kernaussage des Zentralen Grenzwertsatzes besteht darin, dass Zahlenreihen, die als Mittelwerte aus einer Stichprobeneinheit gebildet werden, zu einer Normalverteilung tendieren, unabhängig davon, in welcher Weise die Messwerte verteilt sind (LORENZ, 1992).

a) Methodische Untersuchungen

aa) Die Beschreibung der Zusammenhänge zwischen einfacher und fraktionierter NSBA erfolgte durch lineare Regressionsanalyse. Zur graphischen Darstellung wurden Streudiagramme mit Regressionsgeraden gewählt. Weiterhin wurden der Korrelationskoeffizient (r), das Bestimmtheitsmaß (R^2), das 95%-Konfidenzintervall für die Parameter, der Standardfehler, die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) für die Nullhypothese „ $r = 0$ “ und die Geradengleichung ($y = bx + a$) angegeben.

ab) Zur Beurteilung des Einflusses der Probenlagerung auf die NSBA wurden unter Anwendung des Zentralen Grenzwertsatzes parametrische Tests eingesetzt. Um die einzelnen Bestimmungszeitpunkte miteinander zu vergleichen, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse durchgeführt. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses wurde nachfolgend der STUDENT-NEWMAN-KEULS-Test durchgeführt, um aufzuzeigen, zwischen welchen Zeitpunkten signifikante Unterschiede bestehen. Die graphische Darstellung erfolgte durch Box-and-Whisker-Plots. Bei diesen stellt die schwarze Linie den Median dar. Der Bereich zwischen erstem (25 %-Wert) und drittem Quartil (75 %-Wert) wird durch eine Box begrenzt. Innerhalb dieses Bereiches liegen 50 % der Messwerte. Die unterste Begrenzung des Boxplots gibt den niedrigsten, die oberste Begrenzung den höchsten Messwert an, sofern es sich hierbei nicht um Ausreißer handelt. Werte, die zwischen 1,5 und 3 Boxlängen vom oberen und unteren Rand der Box entfernt sind, werden als Ausreißer bezeichnet und durch Kreise markiert. Extremwerte sind Werte, die mehr als 3 Balkenlängen von der oberen oder unteren Kante des Balkens entfernt sind, und werden mit Sternen markiert.

ac) Die Beschreibung des Harnsediments erfolgte über eine deskriptive Statistik. Es wurden die absoluten Häufigkeiten der vorkommenden Bestandteile für die einzelnen Laktationsgruppen aufgelistet. Ferner wurden die Größenordnungen der Zusammensetzung des Sedimentes aufgelistet.

ad) Die Gegenüberstellung der Bestimmung der NSBA mit und ohne Sediment in den Harnproben erfolgte über die Durchführung des t-Tests für gepaarte Stichproben. Es wurden für die jeweilige Bestimmungsart der Mittelwert (\bar{x}) und die Standardabweichung (s) berechnet, ferner die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) zum Test der Nullhypothese „die

NSBA-Werte mit und ohne Sediment stimmen im Mittel überein“ und die Differenz (d) der jeweiligen Mittelwerte.

ae) Der Einfluss des Füllungszustandes des Probengefäßes auf die NSBA wurde ebenfalls mittels WILCOXON-Test für gepaarte Stichproben beurteilt. Die berechneten Maßzahlen können Abschnitt ad) entnommen werden.

af) Aus den einzelnen Werten der Einzelproben einer Laktationsgruppe der einzelnen Betriebe wurde das arithmetische Mittel (\bar{x}) berechnet und als Mittelwert dem Poolprobenwert der aus den entsprechenden Einzelproben hergestellten Mischproben gegenübergestellt. Unabhängig vom Ergebnis des KOLMOGOROV-SMIRNOV-Tests wurden die üblichen statistischen Maßzahlen arithmetisches Mittel (\bar{x}), Median (x_{M}), Standardabweichung (s) und 95%-Konfidenzintervall für den Erwartungswert berechnet. Über Streudiagramme mit Regressionsgerade erfolgte die graphische Darstellung. Ferner wurden der Korrelationskoeffizient nach PEARSON, Geradengleichung und Bestimmtheitsmaß berechnet.

b) Bestandsuntersuchungen

Unabhängig vom Ergebnis des KOLMOGOROV-SMIRNOV-Tests zur Prüfung auf Normalverteilung wurden für die Poolproben die statistischen Maßzahlen arithmetisches Mittel (\bar{x}), Median (x_{M}), Standardabweichung (s) und die jeweils kleinsten und größten Werte (x_{min} , x_{max}) bestimmt.

ba) Einfluss des Laktationszeitpunktes und der Futterkomponenten auf die Untersuchungsgrößen

Die Anwendung des Zentralen Grenzwertsatzes ermöglicht die Durchführung parametrischer Test. Die Poolwerte der einzelnen Laktationsgruppen wurden über eine einfaktorielle Varianzanalyse verglichen. Wurden signifikante Unterschiede festgestellt, wurde der STUDENT-NEWMAN-KEULS-Test angeschlossen, um aufzuzeigen, zwischen welchen Gruppen die signifikanten Unterschiede bestehen. Die Darstellung erfolgte über Box-and-Whisker-Plots. Die unterbrochen gezeichneten Linien stellen die Referenzwerte für den jeweiligen Parameter dar, welche in der Klinik für Klautiere der FU Berlin im Rahmen der Bestandsbetreuung Anwendung finden. In den Tabellen wurden der Mittelwert der Poolproben (\bar{x}), der Median (x_{M}), die Standardabweichung (s), der 68%-Interquartilsbereich,

der 95%-Interquantiilsbereich aufgeführt, ferner die Prüfgröße F mit dazugehöriger Irrtumswahrscheinlichkeit p für die Varianzanalyse.

bb) Einfluss des Jahresverlaufes auf die Untersuchungsgrößen

Die Darstellung der Verläufe der einzelnen Parameter über den Untersuchungszeitraum erfolgte in Form von Liniendiagrammen. Jede der einzelnen Linien stellt dabei den Mittelwert einer Laktationsgruppe dar. Es wurden jeweils die entsprechenden Gruppen aller Betriebe zusammengefasst. Für Gruppen, die für einen entsprechenden Parameter in der Varianzanalyse signifikante Unterschiede in den Verläufen während des Untersuchungszeitraumes zeigten, wurde die die Signifikanz ($p < 0,05$) hinter der Gruppenbezeichnung vermerkt.

bc) Einfluss der Betriebe auf die Untersuchungsgrößen

Es wurden die Mittelwerte der einzelnen Parameter über den gesamten Untersuchungszeitraum in den einzelnen Betrieben in Tabellenform dargestellt, wobei für jede Laktationsgruppe eine eigene Tabelle erstellt wurde. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Betrieben wurden in Klammer durch die Nummer des jeweiligen Betriebes, zu dem die signifikanten Unterschiede bestanden, vermerkt.

bd) Beziehungen zwischen den einzelnen Parametern

Mögliche Beziehungen zwischen den einzelnen Parametern wurden über eine Korrelationsmatrix geprüft. Die Darstellung erfolgte in Tabellen. Angegeben wurden die Korrelationskoeffizienten. Signifikante Korrelationen auf dem Niveau von $p < 0,05$ wurden mit Sternchen gekennzeichnet.

be) Fraktionierte Elektrolytausscheidung

Das Verhalten der fraktionierten Elektrolytausscheidung zwischen den einzelnen Laktationsgruppen wurde über eine einfaktorielle Varianzanalyse verglichen. Der STUDENT-NEWMAN-KEULS-Test wurde durchgeführt, um zu zeigen, welche Gruppen sich signifikant voneinander unterscheiden. Die Darstellung erfolgte als Box-and-Whisker-Plots mit einer nachfolgenden Tabelle, welche das arithmetische Mittel (\bar{x}), den Median (x), die Standardabweichung (s), den 68%-Interquantiilsbereich, den 95%-Interquantiilsbereich, ferner die Prüfgröße F mit dazugehöriger Irrtumswahrscheinlichkeit p für die Varianzanalyse enthalten.

