# Aus der Klinik für Klauentiere des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration im Blutserum und Blutplasma von Milchkühen

Inaugural- Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von Gerd Gunther Hänske Tierarzt aus Berlin

Berlin, 2019

Journal-Nr.: 4151

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek

Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel

Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh

Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

dairy cows, blood serum, blood plasma, blood parameters, blood composition, animal health, copper, ceruloplasmin, kidneys, liver, monitoring

Tag der Promotion: 17.12.2019



1 Einleitung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Ceruloplasmin und Kupfer	3
2.1.1 Ceruloplasmin (Cp) allgemein	3
2.1.2 Kupfer (Cu)	4
2.1.3 Physiologie und Metabolismus	5
2.1.4 Kupfermangel	8
2.1.5 Toxikose	9
2.1.6 Ceruloplasmin als Akute- Phase- Protein	10
2.1.6.1 Allgemeines	10
2.1.6.2 Positive Akute- Phase- Proteine	11
2.1.6.2.1 Haptoglobin (Hp)	11
2.1.6.2.2 Serum Amyloid A (SAA)	12
2.1.6.2.3 Fibrinogen (Fbg)	12
2.1.6.2.4 Ceruloplasmin (Cp)	12
2.1.6.2.5 Saures alpha-1-Glykoprotein (AGP, Orosomukoid)	13
2.1.6.2.6 Alpha-1 Antitrypsin (ATT)	13
2.1.6.2.7 Laktoferrin	14
2.1.6.3 Negative Akute- Phase- Proteine	14
2.1.6.3.1 Albumin	14
2.1.6.3.2 Transferrin	14
2.1.6.3.3 Transthyretin (TTR)	15
2.1.6.4 Akute- Phase- Proteine als Biomarker	15
2.1.6.4.1 Allgemeines	15
2.1.6.4.2 Akute- Phase- Proteine bei Mastitis	15
2.1.6.4.3 Akute- Phase- Proteine im peripartalen Zeitraum	16
2.1.6.4.4 Akute- Phase- Proteine bei gastrointestinalen Erkrankungen	16
2.1.6.4.5 Akute- Phase- Proteine bei Lahmheiten	17
2.1.6.4.6 Akute- Phase- Proteine bei metabolischen Erkrankungen	17
2.1.6.4.7 Akute- Phase- Proteine bei Kälbern	18
2.1.6.4.8 Akute- Phase- Proteine bei Stress	18

	2.2 Diagnostik	. 19
	2.2.1 Allgemeines	. 19
	2.2.2 Blut	. 19
	2.2.3 Leberproben, Nierenproben	. 22
	2.2.4 Leberenzyme	. 24
	2.2.5 Kupfer im Haar	. 24
	2.2.6 Rationskupfer	. 25
	2.2.7 Besonderheiten der Diagnostik	. 25
	2.2.8 Abhängigkeiten zwischen den Messgrößen	. 26
	2.2.9 Verfahren zur Bestimmung der Ceruloplasminaktivität	. 28
	2.2.10 Maßeinheit der Ceruloplasminkonzentration/ -aktivität	. 30
3	Material und Methoden	. 31
	3.1 Betriebe und Probanden	. 31
	3.2 Proben	. 31
	3.2.1 Probengewinnung	. 31
	3.2.2 Probenaufbereitung	. 32
	3.3 Probenlagerung	. 32
	3.3.1 Allgemeines	. 32
	3.3.2 Lagerungsversuch	. 32
	3.4 Untersuchungsmethode	. 33
	3.4.1 Allgemeines	. 33
	3.4.2 Manuelle Messung	. 34
	3.4.3 Automatisierte Messung	. 36
	3.4.4 Untersuchungen zur Methode	. 37
	3.5 Zuverlässigkeit der Methode	. 38
	3.5.1 Kontrollproben	. 38
	3.5.2 Korrekturfaktor	. 38
	3.5.3 Messgenauigkeit	. 39
	3.6 Auswertung Betriebe	. 40
	3.7 Einzelwerte/ Poolproben	. 40
	3.8 Statistik	. 40
	3.8.1 Datenaufbereitung	. 40
	3.8.1.1 Allgemeines	. 40
	3.8.1.2 Manuelle Messung	. 41

	3.8.1.3 Automatisierte Messung	42
	3.8.1.4 Auswahl Bestände	42
	3.8.2 Statistische Auswertung	43
	3.8.3 Einheiten	44
4	Ergebnisse	45
	4.1 Zuverlässigkeit der Methode	45
	4.1.1 Kontrollproben	45
	4.1.2 Messgenauigkeit	48
	4.1.3 Untersuchungen zur Methode	51
	4.2 Lagerungsversuch	56
	4.2.1 Allgemeines	56
	4.2.2 Lagerung der Proben bei Raumtemperatur (bei 20°C)	56
	4.2.3 Lagerung der Proben im Kühlschrank (bei 8°C)	59
	4.2.4 Lagerung der Proben im Tiefkühler (bei -20°C)	61
	4.2.5 Lagerung der Proben mit Einfrier- Auftauzyklus (bei -20°C)	66
	4.2.6 Vergleich der Lagerung der Proben bei Raumtemperatur und im Kühlschrank	68
	4.2.7 Vergleich der Lagerung der Proben bei Raumtemperatur, im Kühlschrank und b Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus	
	4.3 Auswertung der Betriebe	71
	4.4 Methodenvergleich	76
	4.4.1 Bestimmung des Pearson- Korrelationskoeffizienten zum Vergleich der manuel und automatischen Methode	
	4.4.2 Korrekturfaktor	78
	4.4.3 Bland- Altman- Analyse	83
	4.5 Serum/ Plasma	88
	4.6 Einzelwerte/ Poolproben	90
5	Diskussion	93
	5.1 Material und Methoden	93
	5.1.1 Proben	93
	5.1.2 Untersuchungsmethode	93
	5.1.3 Statistik	94
	5.2 Zuverlässigkeit der Methode	95
	5.2.1 Kontrollproben	95
	5.2.1.1 Kontrollproben allgemein	95
	5.2.1.2 Auffälligkeiten bezüglich der Messungen der Kontrollproben	95

5.2.2 Messgenauigkeit	99
5.3 Lagerungsversuch	102
5.3.1 Allgemeines	102
5.3.2 Lagerung der Proben bei Raumtemperatur (bei 20°C)	103
5.3.3 Lagerung der Proben im Kühlschrank (bei 8°C)	104
5.3.4 Lagerung der Proben im Tiefkühler (bei -20°C)	105
5.3.5 Lagerung der Proben mit Einfrier- Auftauzyklus (bei -20°C)	106
5.3.6 Vergleich der Lagerung der Proben bei Raumtemperatur und im Kühlschrank.	107
5.4 Auswertung der Betriebe	107
5.5 Methodenvergleich	108
5.5.1 Bestimmung des Pearson- Korrelationskoeffizienten zum Vergleich der manue und automatischen Methode	
5.5.2 Korrekturfaktor	108
5.5.3 Bland- Altman- Analyse	109
5.6 Serum/ Plasma	112
5.7 Einzelwerte/ Poolproben	116
6 Schlussfolgerung	117
7 Zusammenfassung	121
8 Summary	124
9 Literaturverzeichnis	127
Tabellenverzeichnis	146
Abbildungsverzeichnis	149
Anhang	152

# Abkürzungsverzeichnis

AGP Saures alpha-1-Glykoprotein

a. p. ante partum

APP Akute- Phase- Protein

AST Aspartat- Amino- Transferase

ATT Alpha-1 Antitrypsin

b Regressionskoeffizient

bzw. beziehungsweise

Cd Cadmium
Co Cobalt

Cp Ceruloplasmin

CRP C- reaktives Protein
Cu(I) einwertiges Kupfer
Cu(II) zweiwertiges Kupfer

Ctr1 Copper Transport Protein 1

Diff Differenz

DMT1 Divalent Metal Transporter 1

EA Einfrieren/ Auftauen (Lagerung)

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EW Einzelwert Fbg Fibrinogen

Fe Eisen

FM Frischmasse

ges gesamt

GLDH Glutamatdehydrogenase

Hp Haptoglobin IL Interleukin

K Kühlschrank (Lagerung)

kDa kilo Dalton

KI Konfidenzintervall
LCu Leberkupfergehalt
LG Laktationsgruppe

M Median
Max Maximum
Min Minimum
Mn Mangan

Mo Molybdän
MT Messtag
MW Mittelwert

n Stichprobengröße NaCl Natriumchlorid

Nr. Nummer
OG Obergrenze

p Signifikanzniveau

P Plasma

PCp Plasmaceruloplasminkonzentration

PCu Plasmakupferkonzentration

PKoFgs Plasmakontrolle mit Gesamtfaktor
PKoFgt Plasmakontrolle mit geteiltem Faktor

p.p. post partum

PPD p- Phenylendiamin- dihydrochlorid

PW Poolwert

r Korrelationskoeffizient

RT Raumtemperatur (Lagerung)

S Serum

SD Standardabweichung

SCp Serumceruloplasminkonzentration

SCu Serumkupferkonzentration

SAA Serum Amyloid A

SKoFgs Serumkontrolle mit Gesamtfaktor SKoFgt Serumkontrolle mit geteiltem Faktor

TM Trockenmasse

TNF Tumor Nekrose Faktor

TS Trockensubstanz

TTR Transthyretin
UG Untergrenze
v. a. vor allem

VB Vollblut

VK Variationskoeffizient

Wo Woche Zn Zink

\_a die automatische Methode betreffend

\_m die manuelle Methode betreffend

## 1 Einleitung

Gesunde Tiere sind das Ziel der tierärztlichen Arbeit und des Herdenmanagements. Entscheidungen müssen im Spannungsfeld politischer, gesellschaftlicher und ökonomischer Gegebenheiten getroffen werden. Dabei sind gesunde leistungsfähige Tiere eng mit dem wirtschaftlichen Erfolg des Betriebes verbunden. Gegenüber der Behandlung offensichtlich erkrankter Einzeltiere gewinnen die Bestandsbetreuung und die Früherkennung von Krankheiten sowie die Überwachung des Gesundheitsstatus der gesamten Herde an Bedeutung. Verschiedene Verfahren können Teil der Bestandsbetreuung sein. Ein wichtiger Baustein ist die Bestimmung aussagekräftiger Laborparameter in Blutproben.

Der Kupferstatus hat einen entscheidenden Einfluss auf die Herdengesundheit. Zu dessen Einschätzung ist die alleinige Bestimmung der Serum- oder Plasmakupferkonzentrationen jedoch unzureichend. Als kupferhaltiges Enzym kann das Akute- Phase- Protein Ceruloplasmin einen ergänzenden Parameter zur Beurteilung der Kupferversorgung darstellen.

Akute- Phase- Proteine können zudem sehr sensitive Indikatoren von Entzündungsreaktionen sein. Dadurch werden sie zur Diagnose, Prognose und Beurteilung des Therapieerfolges genutzt. Eine besondere Bedeutung kommt der Früherkennung von Veränderungen und Erkrankungen zu.

Somit kann Ceruloplasmin in seiner Funktion als Akute- Phase- Protein als wichtiger Laborparameter in der Bestandsdiagnostik Verwendung finden. Zur quantitativen Bestimmung dieses Enzyms sind zahlreiche Methoden beschrieben. Bisher hat sich jedoch keine als besonders geeignet erwiesen. Zudem handelt es sich hauptsächlich um manuelle Untersuchungsmethoden. Insbesondere zur Bewältigung größerer Probenmengen wäre ein automatisiertes Messverfahren vorteilhaft.

Ziel dieser Arbeit ist es, auf der Grundlage des manuellen Verfahrens nach Sunderman und Nomoto (1970) ein automatisiertes Messverfahren zur Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration im Blutserum und Blutplasma von Rindern zu etablieren. Die hierfür erforderlichen Blutproben werden im Rahmen der Bestandsbetreuung durch die Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin gewonnen.

Zunächst soll durch Untersuchungen zur jeweiligen Methode geklärt werden, ob diese den Anforderungen an ein labordiagnostisches Messverfahren genügen. Insbesondere eine ausreichende Präzision ist essenziell für den routinemäßigen Einsatz einer Methode. Dazu sollen die intra- und interday- Variationskoeffizienten bestimmt werden.

Eine hinreichende Stabilität der Konzentration eines Blutparameters ist eine Voraussetzung für dessen routinemäßige labordiagnostische Bestimmung. Logistische Gegebenheiten können eine entsprechende Probenlagerung erfordern. Über die Stabilität der Ceruloplasminkonzentration unter verschiedenen Lagerungsbedingungen ist jedoch bisher wenig bekannt. Die Ergebnisse der Lagerung von Blutproben bei Raumtemperatur, im Kühlschrank und im Tiefkühler sollen Aufschluss über den Einfluss verschiedener Lagerungsbedingungen geben. Zudem ist beabsichtigt, den Einfluss eines Einfrier-/ Auftauzyklus zu untersuchen.

Die im Rahmen der Bestandsbetreuung gewonnen Blutproben sollen, getrennt nach den jeweiligen Herkunftsbetrieben und zusätzlich nach Laktationsgruppen, bearbeitet werden. Es ist eine parallele Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration mit der manuellen und der automatischen Methode vorgesehen.

Anhand der erzeugten Daten kann ein Methodenvergleich angestellt werden. Dieser erfolgt über die Ermittlung der Korrelationskoeffizienten und die Durchführung einer Bland- Altman-Analyse.

Außerdem ist ein Vergleich der Konzentrationen in Serum- und den entsprechenden Plasmaproben vorgesehen.

Zusätzlich soll überprüft werden, inwieweit die Untersuchung von Poolproben anstelle der Untersuchung von Einzelproben geeignet ist.

### 2 Literaturübersicht

### 2.1 Ceruloplasmin und Kupfer

### 2.1.1 Ceruloplasmin (Cp) allgemein

Ceruloplasmin ist ein kupferhaltiges Protein des Säugerblutes (Ramos et al. 2016), das eine Oxidaseaktivität gegenüber einer Vielzahl von Substraten besitzt. Es spielt eine wichtige Rolle im Eisenstoffwechsel, da es in der Lage ist, Eisen(II) zu oxidieren (Curzon 1961; Vashchenko & MacGillivray 2013). Die Fähigkeit der Oxidation von aromatischen Diaminen (McDermott et al. 1968; Young & Curzon 1972) ist die Voraussetzung für die Ceruloplasminbestimmung nach Sunderman und Nomoto (1970). Außerdem ist Ceruloplasmin ein Akute- Phase- Protein (MacIntyre et al. 2004; Roberts & Sarkar 2008; Sarnat-Kucharczyk et al. 2016) und an der Radikaldetoxifikation (Cousins 1985) beteiligt.

Ryden (1972) fand heraus, dass das Ceruloplasmin von Menschen, Schweinen, Pferden und Hasen aus einer Einzelstrangpolypeptidkette ähnlicher Größe besteht. Neben dieser Gemeinsamkeit wurde auch über Unterschiede berichtet. Beispielsweise fanden Ryan et al. (1992) in humanem Ceruloplasmin, verglichen mit dem Protein der Ratte, eine vierfach höhere Ferrooxidaseaktivität. Zwischen humanem und bovinem Ceruloplasmin bestehen nicht nur Unterschiede in der Zuckerzusammensetzung, sondern auch in der Primärstruktur (Boivin et al. 2001).

Für bovines Ceruloplasmin wurden Molekulargewichte von 123 kDa ±2 kDa (Calabrese et al. 1981) bzw. 125,1 kDa (Boivin et al. 2001) ermittelt. Ein Ceruloplasminmolekül trägt ca. sechs Kupferatome (Calabrese et al. 1981). Der Hauptsyntheseort für dieses Protein ist die Leber (Laven et al. 2007), es kann bei der Ratte aber auch in der Plazenta und im Hoden gebildet werden (Aldred et al. 1987). Die Halbwertzeit beträgt 5,5 Tage. Weil das Kuproenzym 80 (Laven et al. 2007) bis 95 % (Cousins 1985; Terada et al. 1995; Hellman & Gitlin 2002; Roberts & Sarkar 2008) des Plasmakupfers enthält, kann es als Hauptkupferquelle für das extrahepatische Gewebe angesehen werden (Cousins 1985).

### 2.1.2 Kupfer (Cu)

Das Übergangsmetall Kupfer ist ein chemisches Element mit der Ordnungszahl 29 (Matthias et al. 2003). Im Periodensystem der Elemente ist es in der vierten Periode und der ersten Nebengruppe eingeordnet.

Kupfer ist ein essentielles Spurenelement (Minatel & Carfagnini 2002; Tapiero et al. 2003; Laven & Livesey 2004; Cabrera et al. 2008; Broderius & Prohaska 2009; Nose & Thiele 2010; Nose et al. 2010; Suttle 2010), das in allen lebenden Organismen gefunden wurde (Tapiero et al. 2003). Es kommt sowohl als oxidiertes Cu(II) als auch als reduziertes Cu(I) vor (Tapiero et al. 2003; Nose & Thiele 2010). Als Co- Faktor oder Bestandteil verschiedener Enzyme und Proteine ist es unerlässlich für eine Vielzahl biochemischer Reaktionen (Minatel & Carfagnini 2002; Tapiero et al. 2003; Bartee & Lutsenko 2007; Nose & Thiele 2010; Nose et al. 2010; Suttle 2010). So ist Kupfer beispielsweise bedeutend für den Eisenmetabolismus (Tapiero et al. 2003; Nose & Thiele 2010; Suttle 2010), die mitochondriale Atmung (Nose & Thiele 2010; 2010; Suttle 2010), die Neurotransmitterbiogenese und für die Bindegewebsentwicklung (Tapiero et al. 2003; Laven & Livesey 2004; Nose et al. 2010). Da Kupfer leicht ein Elektron aufnehmen oder abgeben kann (Linder & Hazegh-Azam 1996), kommt ihm ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies zu (Linder & Hazegh-Azam 1996; Tapiero et al. 2003; Nose & Thiele 2010; Nose et al. 2010; Suttle 2010). Allerdings kann überschüssiges Kupfer auch zu einer Schädigung von Zellbestandteilen führen (Tapiero et al. 2003; La Fontaine & Mercer 2007). In Tabelle 1 sind verschiedene Enzyme aufgeführt, an deren Funktion Kupfer beteiligt ist.

Tabelle 1: Kupferhaltige Enzyme

Enzym	Autor
Ceruloplasmin	(Calabrese et al. 1981; Blakley & Hamilton 1985; Terada et al. 1995;
(Ferrooxidase)	Linder & Hazegh-Azam 1996; Bonham et al. 2002; Hellman & Gitlin 2002;
	Minatel & Carfagnini 2002; Tapiero et al. 2003; Bartee & Lutsenko 2007;
	Laven et al. 2007; Suttle 2010)
Cytochrom- c-	(Scott & Turnlund 1994; Terada et al. 1995; Linder & Hazegh-Azam
Oxidase	1996; Bonham et al. 2002; Minatel & Carfagnini 2002; Tapiero et al.
	2003)
Diaminoxidase	(Linder & Hazegh-Azam 1996; Bonham et al. 2002; Tapiero et al. 2003;
	Legleiter & Spears 2007)
Dopamin- ß-	(Linder & Hazegh-Azam 1996; Bonham et al. 2002; Tapiero et al. 2003)
Monooxigenase	
Hephaestin	(Tapiero et al. 2003)
Ferrooxidase II	(Linder & Hazegh-Azam 1996; Bonham et al. 2002; Tapiero et al. 2003)
Lysyloxidase	(Scott & Turnlund 1994; Linder & Hazegh-Azam 1996; Bonham et al.
	2002; Minatel & Carfagnini 2002; Herdt & Hoff 2011)
Monoamino-	(Linder & Hazegh-Azam 1996; Bonham et al. 2002)
oxidase	
Superoxid-	(Scott & Turnlund 1994; Terada et al. 1995; Linder & Hazegh-Azam
dismutase	1996; Bonham et al. 2002; Minatel & Carfagnini 2002; Tapiero et al.
	2003; Bartee & Lutsenko 2007; Herdt & Hoff 2011)
Tyrosinase	(Linder & Hazegh-Azam 1996; Bonham et al. 2002; Tapiero et al. 2003;
	Bartee & Lutsenko 2007; Herdt & Hoff 2011)

### 2.1.3 Physiologie und Metabolismus

Der Mensch ist in der Lage, große Teile des in der Nahrung vorhandenen Kupfers zu resorbieren (Roberts & Sarkar 2008). Beim Wiederkäuer wird dagegen nur ein geringer Anteil absorbiert (Balemi et al. 2010; Suttle 2010). Einige Autoren vermuten, dass die Absorptionsrate an die Kupferkonzentration in der Nahrung angepasst wird (Nyasae et al. 2007). Nach Roberts und Sarkar (2008) erfolgt keine Regulation der Kupferaufnahme. Beim Säuger findet die Kupferabsorption nach der Verdauung in Magen und Duodenum, wahrscheinlich hauptsächlich im Dünndarm statt (Linder & Hazegh-Azam 1996; Tapiero et al.

2003; Bertinato & L'Abbe 2004; Roberts & Sarkar 2008). Kupfer kann in die Zellen diffundieren (Linder & Hazegh-Azam 1996) oder mit Hilfe eines energieunabhängigen Kupfertransporters (Linder & Hazegh-Azam 1996; Tapiero et al. 2003; Nose et al. 2010) (Ctr1) bzw. eines unspezifischen Metalltransporters (DMT1) (Garrick et al. 2003) die apikale Membran überwinden. Bei Ratten, Mäusen und Schweinen konnte das Vorkommen eines apikalen Ctr1 bereits bestätigt werden (Nose et al. 2010). Der hauptsächlich der Eisenaufnahme dienende Transporter DMT1 spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Kupferabsorption (Arredondo et al. 2003). Hansen et al. (2010) konnten einen DMT1 im bovinen Duodenum nachweisen. Nach Arredondo et al. (2003) werden sogar mindestens 50 % des aufgenommenen Kupfers über den DMT1 aufgenommen. Dabei wird Cu+ etwa 10-fach effektiver als Cu2+ transportiert (Arredondo et al. 2003). Die Kupferaufnahme wird durch divalente Metallionen wie Cadmium, Mangan, Cobalt und Zink kompetitiv gehemmt (Linder & Hazegh-Azam 1996). An der apikalen Membran konkurrieren verschiedene Ionen um den DMT1. Intrazellulär oder in Körperflüssigkeiten liegen Kupferionen nicht frei vor, sondern sind an Proteine oder Peptide gebunden. Da freies Kupfer hochreaktiv ist, stellt diese Bindung einen effektiven Schutz der Zellbestandteile vor oxidativer Schädigung dar (Linder & Hazegh-Azam 1996; Nose et al. 2010). Circa 80 % des aufgenommenen Kupfers werden in der Mukosazelle zurückgehalten und an Metallothionein (Linder & Hazegh-Azam 1996), Glutathion oder Proteine ähnlicher Größe gebunden (Tapiero et al. 2003). Weiss et al. (2008) vermuten in den Enterozyten einen wichtigen Teil der Kupferhomöostase. Möglicherweise wird überschüssiges Kupfer direkt über die ATPase 7B wieder in das Darmlumen abgegeben oder es wird bis zur Abschilferung der Zellen in Vesikeln sequestriert und somit schließlich über den Kot ausgeschieden (Weiss et al. 2008). Der geschwindigkeitslimitierende Schritt der Kupferaufnahme findet an der basolateralen Seite der Zelle statt (Linder & Hazegh-Azam 1996). Unter normalen Umständen überwindet Kupfer mit Hilfe eines energieabhängigen, sättigbaren Mechanismus diese Barriere (Linder & Hazegh-Azam 1996). Bartee und Lutsenko (2007) sowie Nose und Thiele (2010) fanden im Menschen eine Cu(I) transportierende ATPase, welche den Transport zum sekretorischen Lumen bzw. die Ausschleusung aus der Zelle bewirkt. Nach Nyasae et al. (2007) überwindet Kupfer über die ATPase 7A die basolaterale Membran der intestinalen Zellen. Bei höheren Kupferaufnahmen kommen wahrscheinlich Diffusion oder ein transportermediiertes System hinzu (Linder 1991). Während der Überwindung der basolateralen Membran steht Kupfer vermutlich ebenfalls mit anderen Metallionen in Konkurrenz (Linder 1991). In Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Kupfer konnte herausgefunden werden, dass es nach dem Übertritt ins Plasma an Albumin (Roberts & Sarkar 2008) und Transkuprein gebunden wird (Liu et al. 2007). Linder et al. (1998) berichten, dass eine Bindung an einzelne Aminosäuren eher nicht stattfindet. Nach Roberts und Sarkar (2008) wird Kupfer an Aminosäuren gebunden, v. a. an Histidin. Anschließend wird es zur Leber und

Niere transportiert (Linder et al. 1998). An den Leber- und Nierenzellen wird das Kupfer vermutlich von den Transportern an spezifische Rezeptoren übergeben (Linder et al. 1998). Eine Schlüsselrolle bei der Kupferaufnahme in die Zelle spielt der Ctr1- Transporter (Bertinato & L'Abbe 2004; Roberts & Sarkar 2008; Lutsenko 2010; Suttle 2010). Dieser wird vor allem in der Plasmamembran und in intrazellulären Vesikeln gefunden (Lutsenko 2010). In den Hepatozyten wird das Kupfer an Chaperone (ATOX1) gebunden und zum Golgiapparat transportiert, wo es mit Hilfe bestimmter kupfertransportierender ATPasen aufgenommen und in Ceruloplasmin (ATP7B) oder in andere Kuproenzyme (ATP7A) inkorporiert wird (Bertinato & L'Abbe 2004; La Fontaine & Mercer 2007; Roberts & Sarkar 2008). Dabei erfolgt der Einbau von Kupfer in Apoceruloplasmin, wodurch Holoceruloplasmin entsteht (La Fontaine & Mercer 2007; Yanagimoto et al. 2009; Yanagimoto et al. 2011). Anschließend wird das Holoceruloplasmin in die Blutbahn sekretiert (Roberts & Sarkar 2008; Yanagimoto et al. 2011). Campbell et al. (1981) fanden in Untersuchungen mit radioaktiv markiertem Ceruloplasmin heraus, dass das Ceruloplasmin- Kupfer schneller als die Ceruloplasmin- Proteinuntereinheit in die Zelle aufgenommen wird. Daraus schlussfolgern Ramos et al. (2016), dass Ceruloplasmin- Kupfer unabhängig von der Ceruloplasmin- Proteineinheit in die Zelle gelangt und die Aufnahme somit nicht via Endozytose erfolgt. Unter normalen Bedingungen ist das Kupfer fest mit dem Ceruloplasmin verbunden und kann nicht einfach herausgelöst werden (Ramos et al. 2016). Um das Kupfer freizugeben, entfaltet sich das Ceruloplasminmolekül vermutlich z.B. bei Bindung mit dem CTR1 oder anderen Zellmembranbestandteilen (Ramos et al. 2016). Ramos et al. (2016) nehmen an, dass sich das kupferbindende Holoceruloplasmin zur Kupferfreigabe an der äußeren Zellmembran zum Apoceruloplasmin umwandelt. Dies würde auch erklären, warum ein gewisser Teil des Plasmaceruloplasmins in der Apo- Form vorliegt (Ramos et al. 2016).

Überschüssiges Kupfer wird hauptsächlich durch biliäre Exrektion (ATP7B) ausgeschieden (Linder & Hazegh-Azam 1996; Tapiero et al. 2003; Weiss et al. 2008; La Fontaine et al. 2010). Dabei kann das Kupfer direkt oder über Vesikel ausgeschleust werden (La Fontaine & Mercer 2007). Ein geringer Kupferanteil wird auch über die Niere eliminiert (Roberts & Sarkar 2008). Insgesamt ist der exakte Weg der Kupferdistribution unvollständig geklärt (Lutsenko et al. 2007; Roberts & Sarkar 2008).

### 2.1.4 Kupfermangel

Kupfermangel ist bei Rindern einer der häufigsten Mineralstoffmängel weltweit (Telfer et al. 1996; Minatel & Carfagnini 2002). Es gibt keine spezifischen Symptome, die sicher den Schluss Kupfermangel zulassen (Smart et al. 1992; Suttle 2010). Veränderungen der Fellfarbe (Suttle 2010), verminderte Fruchtbarkeit (Steffl et al. 2009), Leistungsminderung (Gould & Kendall 2011), Knochenerkrankungen (Humphries et al. 1983) und geschwächte Immunfunktion können Zeichen eines Kupfermangels sein (Puls 1988; Telfer et al. 1996; Laven & Livesey 2005; Herdt & Hoff 2011). Die Entstehung eines Kupfermangels kann in vier Phasen unterteilt werden (Suttle 2010). Zunächst kommt es zu einer Entspeicherung des Hauptspeicherorgans, der Leber (Suttle 2010). Hierfür muss die Kupferaufnahme aus dem Darm zu gering sein, um die Bedürfnisse des Tieres zu erfüllen (Laven et al. 2007). Hält dieser Umstand längere Zeit an, werden die Leberreserven verbraucht und es folgt eine Mangelsituation (Laven et al. 2007; Suttle 2010). Diese äußert sich in einem Rückgang der Kupferkonzentration im Transportpool, d.h. die Plasmakupferkonzentration sinkt (Suttle 2010). Die sich anschließende Phase der Dysfunktion ist durch eine Abnahme der Konzentration und Aktivität der kupferhaltigen Enzyme gekennzeichnet (Suttle 2010). Schließlich kommt es zur klinischen Erkrankung (Suttle 2010).

Es gilt, einen primären von einem sekundären Mangel zu unterscheiden (Wikse et al. 1992). Der primärere Kupfermangel tritt infolge einer nicht bedarfsgerechten Versorgung auf (Humphries et al. 1983; Gengelbach & Spears 1998; Laven & Livesey 2005; Herdt & Hoff 2011). Eine gestörte Kupferabsorption oder ein beeinträchtigter Kupfermetabolismus durch die Interaktion von Kupfer mit anderen Rationsbestandteilen kann zu sekundärem Kupfermangel führen (Humphries et al. 1983; Wikse et al. 1992; Gengelbach & Spears 1998; Laven & Livesey 2005; Herdt & Hoff 2011). Dabei beeinflussen die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Kupfersalze bzw. der antagonistischen Elemente, besonders deren Löslichkeit im Pansen, den Grad der Interaktion (Laven & Livesey 2005). Die bedeutendsten Antagonisten sind Mo, S (Suttle 1991; Cerone et al. 1998; Herdt & Hoff 2011), Fe (Gengelbach & Spears 1998; Gould & Kendall 2011), Zn (Humphries et al. 1983; Laven & Livesey 2004), Cd (Laven & Livesey 2005), Mn und Co. Molybdän und Schwefel können sich im Pansen zu Molybdän- Schwefelverbindungen (Thiomolybdaten) zusammenschließen (Telfer et al. 1996; Kincaid 1999; Laven & Livesey 2005; Gould & Kendall 2011). Eisen- Schwefelverbindungen können ebenfalls entstehen (Telfer et al. 1996). Durch Bindung von Kupfer entstehen nicht resorbierbare Komplexe (Telfer et al. 1996; Gould & Kendall 2011). Wenn im Pansen kein Kupfer an die Thiomolybdate bindet, können diese über den Magen- Darm- Trakt absorbiert werden (Laven & Livesey 2005; Gould & Kendall 2011) und gelangen über den Blutstrom in die Leber (Telfer et al. 1996). Kupfer, das dort Komplexe mit den Thiomolybdaten bildet, steht ebenfalls nicht für die kupferabhängigen Enzyme zur Verfügung (Telfer et al. 1996). Zusätzlich können kupferhaltige Enzyme auch direkt gebunden werden (Gould & Kendall 2011). Der Antagonismus zwischen Kupfer und Eisen beeinflusst außerdem die Kupferabsorptionsfähigkeit (Humphries et al. 1983; Underwood & Suttle 1999; Laven & Livesey 2005; Hansen & Spears 2009). So konkurrieren beispielsweise zweiwertiges Eisen und Mangan mit Kupfer um die Absorption über den DMT1 (Hansen & Spears 2009).

#### 2.1.5 Toxikose

Viele Landwirte supplementieren Kupfer, ohne einen umfassenden Überblick über die Kupferversorgung ihrer Tiere zu haben (Laven & Livesey 2004; Balemi et al. 2010). Dies kann dazu führen, dass die Kühe weit über ihren Bedarf hinaus mit Kupfer versorgt werden, was nach einiger Zeit möglicherweise in einer Kupferintoxikation resultiert. Die Kupfervergiftung ist ein zweistufiger Prozess, welcher zunächst durch eine Kupferakkumulation in der Leber charakterisiert ist (Laven & Livesey 2004). Diese erste Stufe kann klinisch inapparent verlaufen. Dennoch kommt es im Verlauf zu einer Leberdegeneration, in deren Folge Leberenzyme freigesetzt werden, welche dann im Blutplasma vermehrt nachgewiesen werden können (Underwood & Suttle 1999). Im zweiten Schritt kommt es zu einer umfassenden Leberdegeneration und einer massiven Freisetzung von Kupfer (Laven & Livesey 2004; Herdt & Hoff 2011). Das freie Kupfer wird in den Nieren filtriert und akkumuliert (Laven & Livesey 2004). Somit fungiert die Niere als Indikatororgan für eine Leberdegeneration, wohingegen erhöhte Leberkupferwerte zwar für eine Kupferakkumulation, aber nicht notwendigerweise für eine Degeneration der Leber sprechen (Laven & Livesey 2004; Herdt & Hoff 2011). Ab einer gewissen Menge an freigesetztem Kupfer kommt es zu einer intravasalen Hämolyse (Puls 1988; Bidewell et al. 2000; Laven & Livesey 2004). Eine Erhöhung des Serumkupferspiegels tritt bis zu diesem Zeitpunkt nicht auf (Puls 1988). Leistungsminderung, Apathie, Ikterus, Methämoglobinämie, Hämoglobinurie bis hin zu Ataxie und Festliegen der Rinder können weitere Symptome einer Kupfervergiftung sein (Bidewell et al. 2000; Laven & Livesey 2004). Post mortem können eine geschwollene gelbbraune Leber, eine nekrotisierende Hepatopathie, vergrößerte dunkelbraune bis schwarze Nieren und eine Nephropathie eine Kupfervergiftung anzeigen (Laven & Livesey 2004). Allerdings treten klinische Veränderungen erst bei einer hochgradigen Leberdegeneration bei gleichzeitigem Auftreten hoher Blutkupferwerte in Erscheinung (Laven & Livesey 2004). Dennoch sollte man eine Kupfervergiftung nicht allein anhand der klinischen oder der post mortem Symptome

diagnostizieren (Laven & Livesey 2004). Eine Überprüfung der Kupferversorgung ist notwendig. Diese kann über das Blut, die Leberkupferkonzentration oder idealerweise über eine Nierenprobe erfolgen (Laven & Livesey 2004). Jedoch ist der Nutzen der Bestimmung des Blutkupferspiegels umstritten, da die Blutspiegel durch die Speicherfunktion der Leber bis zur Dekompensation konstant gehalten werden (Herdt & Hoff 2011). Die Prävalenz und Inzidenz klinischer Erkrankungen sind sehr gering (Livesey et al. 2002). Allerdings wurde ein deutlicher Anstieg zumindest an überversorgten Rindern beobachtet (Grace & Knowles 2015). Auch in einer anderen Untersuchung wurde ein erheblicher Anteil an Tieren, deren Kupferversorgung über den Empfehlungen lag, registriert (Sinclair & Atkins 2015). Außerdem scheint es familiäre Unterschiede hinsichtlich der Empfänglichkeit für diese Erkrankung zu geben (Crawshaw 2002). Zudem sind auch verschiedene Rassen unterschiedlich anfällig, bzw. gibt es genetische Unterschiede bezüglich der Empfänglichkeit (Balemi et al. 2010; Kendall et al. 2015). Demnach erkranken beispielsweise Jersey- Rinder eher an einer Toxikose als Holstein- Friesian (Kendall et al. 2015). So können besonders empfängliche Tiere in Erscheinung treten, während ein Großteil klinisch der Herde subklinische Leberdegenerationen aufweist (Laven & Livesey 2004). Kälber sind generell gefährdeter als ausgewachsene Tiere (Puls 1988; Herdt & Hoff 2011). Vermutlich wird die Kupfertoxizität als mögliche Diagnose häufig nicht in Erwägung gezogen (Laven & Livesey 2004). Eine mögliche Ursache ist, dass klinische Erkrankungen mit einer geringen Herdenprävalenz auftreten (Livesey et al. 2002). Außerdem verursachen einige andere Erkrankungen wie Leptospirose, Kohlvergiftung und postpartale Hämoglobinurie ähnliche Symptome (Laven & Livesey 2004).

### 2.1.6 Ceruloplasmin als Akute- Phase- Protein

### 2.1.6.1 Allgemeines

Die Akute- Phase- Reaktion ist Teil des angeborenen Immunsystems (Murata et al. 2004). Sie dient vor allem in der frühen Phase der Wirtsschädigung, der Wiederherstellung der Homöostase und Beseitigung der ursächlichen Störung (Kushner 1982; Moshage 1997; Ebersole & Cappelli 2000; Murata et al. 2004). Sie ist durch verschiedene systemische Veränderungen charakterisiert (Ebersole & Cappelli 2000; Ceron et al. 2005; Ceciliani et al. 2012). Dazu gehören Fieber, Leukozytose (Paltrinieri 2008), erhöhte Blutcortisol- und verminderte Thyroxinkonzentrationen (Ceron et al. 2005). Auch metabolische Veränderungen wie Lipolyse, Glukoneogenese und Muskelkatabolismus sowie verminderte Serumeisen- und Zinkkonzentrationen können während einer Akute- Phase- Antwort auftreten (Ceron et al. 2005). Außerdem kommt es zu einer Konzentrationsveränderung verschiedener

Plasmaproteine (Moshage 1997; Murata et al. 2004; Ceron et al. 2005; Ceciliani et al. 2012). Diese werden Akute- Phase- Proteine (APPs) genannt (Murata et al. 2004). Dabei kann es sowohl zu einem Konzentrationsanstieg, so genannte positive APPs wie Ceruloplasmin, Haptoglobin (Hp) (Trevisi et al. 2009), C- reaktives Protein (CRP) oder Serum Amyloid A (SAA), als auch zu einem Konzentrationsabfall, so genannte negative APPs wie Albumin oder Transferrin, kommen (Murata et al. 2004; Ceron et al. 2005). Die meisten positiven APPs sind Glykoproteine (Ebersole & Cappelli 2000; Ceron et al. 2005). Sie werden größtenteils in den Hepatozyten (Tothova et al. 2014) infolge eines Stimulus proinflammatorischer Cytokine synthetisiert und anschließend in die Blutbahn abgegeben (Moshage 1997; Ebersole & Cappelli 2000; Ostberg et al. 2000; Murata et al. 2004; Ceron et al. 2005). Zu den bedeutendsten proinflammatorischen Cytokinen gehören Interleukin (IL)- 6 (Yoshioka et al. 2002), IL- 1 und Tumor Nekrose Faktor (TNF) α (Ostberg et al. 2000; Ceron et al. 2005). Diese werden von Makrophagen aber auch anderen Zellen als Reaktion auf externe oder interne Reize gebildet (Ostberg et al. 2000; Murata et al. 2004). Andere Untersuchungen lassen vermuten, dass APPs auch von extrahepatischen Geweben gebildet werden können (Ceron et al. 2005; Ceciliani et al. 2012). Die Akute- Phase- Reaktion ist eine unspezifische und komplexe Reaktion (Ceron et al. 2005). Sie tritt sekundär zu infektiösen, immunologischen, neoplastischen oder traumatischen Veränderungen auf (Murata et al. 2004). Die Akute-Phase- Reaktion ist eine sehr schnelle Reaktion, die vor der Stimulation der spezifischen Immunantwort und vor der Entwicklung klinischer Symptome auftreten kann (Ceron et al. 2005). Daher kann sie als einer der frühesten Marker für einen pathologischen Prozess oder eine Krankheit angesehen werden (Murata et al. 2004; Ceron et al. 2005; Ceciliani et al. 2012; Tothova et al. 2014; Brodzki et al. 2015). Die Produktion der Akute- Phase- Proteine unterliegt erheblichen speziesabhängigen Unterschieden (Kushner 1982; Murata et al. 2004; Ceron et al. 2005; Ceciliani et al. 2012; Tothova et al. 2015).

### 2.1.6.2 Positive Akute- Phase- Proteine

#### **2.1.6.2.1 Haptoglobin (Hp)**

Haptoglobin besteht aus zwei α- und zwei β- Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (Morimatsu et al. 1991). Es hat ein Molekulargewicht von etwa 1000- 2000 kDa (Godson et al. 1996). Hp ist in der Lage, das von Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin zu binden und somit auch eine Schädigung durch seine oxidativen Fähigkeiten zu verhindern (Yang et al. 2003; Ceciliani et al. 2012). Außerdem wird dadurch die Verfügbarkeit der Häm-Reste für bakterielles Wachstum vermindert (Aytekin et al. 2016). Auf die Chemotaxis von

Granulozyten, Phagozytose und bakterielle Aktivität hat Hp einen hemmenden Effekt (Rossbacher et al. 1999). Des Weiteren kann Hp zur Diagnostik und Einschätzung des Schweregrades von Entzündungsreaktionen bei verschiedenen Erkrankungen genutzt werden (Eckersall 2000).

### 2.1.6.2.2 Serum Amyloid A (SAA)

Serum Amyloid A (SAA) gehört zur Familie der Apolipoproteine (Uhlar et al. 1994). In Abhängigkeit vom Entzündungsstimulus werden verschiedene SAA- Isoformen gebildet (Jensen & Whitehead 1998). SAA 1 und SAA 2 entstehen während einer Entzündung vornehmlich in der Leber (Weber et al. 2006). SAA 3 wird in verschiedenen Geweben einschließlich der Milchdrüse produziert (McDonald et al. 2001; Weber et al. 2006). Die biologischen Funktionen von SAA sind bisher nicht vollständig aufgeklärt (Petersen et al. 2004; Ceciliani et al. 2012). Zu den Hauptaufgaben zählen der Rücktransport vom Cholesterol von den Geweben zu den Hepatozyten, die Opsonierung und immunmodulatorische Aktivitäten (Ceciliani et al. 2012).

#### **2.1.6.2.3 Fibrinogen (Fbg)**

Fibrinogen (Fbg) ist ein β- Globulin (Ceron et al. 2005), welches aus drei Polypeptidketten besteht, die über Disulfidbrücken und ein Glykoprotein verknüpft sind (Henschen 1983). Bei der Wundheilung spielt es eine wichtige Rolle und als Substrat für die Fibrinbildung ist es an der Hämostase beteiligt (Fuss et al. 2001; Davalos & Akassoglou 2012; Lassila 2016). Während einer Entzündungsreaktion kann das Fibrinogenlevel um das Zwei- bis Dreifache ansteigen (Medcalf 2007).

### 2.1.6.2.4 Ceruloplasmin (Cp)

Für das Ceruloplasmin gibt es ebenfalls eine Vielzahl von Studien, die dessen diagnostischen Nutzen als APP untersucht haben. Beispielsweise konnte ein Zusammenhang zwischen dem Gesundheitsstatus des Euters und den Konzentrationen von Cp und SAA in der Milch

hergestellt werden (Szczubial et al. 2012), so dass Cp und SAA unter bestimmten Umständen zur Diagnose einer subklinischen Mastitis genutzt werden können (Szczubial et al. 2012). Die Ceruloplasminaktivität unterliegt in dem Zeitraum nach der Abkalbung einer physiologischen Erhöhung (Hussein 2012; Trevisi et al. 2012). In einer Untersuchung war die Ceruloplasminaktivität in der Gruppe der Frischlaktierenden (0-1 Woche post partum) am höchsten (Hussein 2012). Der Anstieg in dieser Gruppe deutet darauf hin, dass es durch den oxidativen Stress um den Geburtszeitpunkt zu einem physiologischen Anstieg in der Akute-Phase- Antwort kommt (Castillo et al. 2005; Hussein & Staufenbiel 2011). Bei Stress haben Rinder erhöhte Blutkupferspiegel (Ward & Spears 1999) und Ceruloplasminaktivitäten (Hussein 2012). Des Weiteren kann die Ceruloplasminbestimmung die Endometritisdiagnostik und Therapieüberwachung unterstützen (Kaya et al. 2016). Der Schweregrad der Endometritis korreliert mit der Ceruloplasminkonzentration (Kaya et al. 2016).

### 2.1.6.2.5 Saures alpha-1-Glykoprotein (AGP, Orosomukoid)

Das Saure alpha-1-Glykoprotein (AGP) ist ein Glykoprotein mit einem Kohlenhydratanteil von über 45 % (Fournier et al. 2000). Bovines AGP hat ein Molekulargewicht von 20,5kDa (Ceciliani et al. 2012). Es besitzt vermutlich antiinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften (Murata et al. 2004; Ceciliani et al. 2012). Außerdem scheint AGP notwendig zu sein, um die Kapillarpermeabilität aufrecht zu halten (Fournier et al. 2000). Zusätzlich hat es große Bedeutung bei der Bindung von Medikamenten im Plasma und somit auch Auswirkungen auf deren Pharmakokinetik (Murata et al. 2004; Ceciliani et al. 2012; Huang & Ung 2013). Bei den meisten Spezies zeigt AGP eine moderate Akute- Phase- Antwort und wird eher mit chronischen Prozessen in Verbindung gebracht.

#### 2.1.6.2.6 Alpha-1 Antitrypsin (ATT)

Das APP Alpha-1 Antitrypsin (ATT) ist ein Serinproteasehemmer. Als solches hemmt es Serinproteasen, wie die neutrophile Elastase (Dabbagh et al. 2001; Lomas 2006; Gooptu & Lomas 2009). Bei bestimmten Entzündungsreaktionen kommt es in erhöhten Mengen vor, um die Gewebeschädigungen durch die von neutrophilen Granulozyten ausgeschüttete Elastase zu begrenzen (Janciauskiene et al. 2011).

#### 2.1.6.2.7 Laktoferrin

Laktoferrin ist ein globuläres Glykoprotein mit einer hohen Eisenbindungsaffinität (Metz-Boutigue et al. 1984; Ward et al. 2002; Legrand et al. 2005) und einem Molekulargewicht von etwa 80kDa (Metz-Boutigue et al. 1984). Neben der Eisenbindung besitzt es auch immunmodulatorische Funktionen (Legrand et al. 2005). Es wird von Drüsenzellen sezerniert, bedeckt Schleimhautoberflächen und wirkt dort als bakteriostatisches und bakterizides Molekül (Legrand et al. 2005). Somit ist es ein wichtiger Bestandteil der Wirtsabwehr gegen Bakterien, Pilze und Viren (Ward et al. 2002; Legrand et al. 2005).

#### 2.1.6.3 Negative Akute- Phase- Proteine

#### 2.1.6.3.1 Albumin

Serumalbumin ist das wichtigste negative APP (Tothova et al. 2014). Das globuläre Protein hat ein Molekulargewicht von 69kDa (Tothova et al. 2014). Es dient als Transportprotein (Tothova et al. 2014) und hat somit auch einen bedeutenden Einfluss auf die Bindung verschiedener Medikamente (Murata et al. 2004; Ceron et al. 2005). Während der Akute-Phase- Reaktion steigt der Bedarf an Aminosäuren für die Produktion positiver APPs deutlich an, so dass eine Anpassung der Proteinsynthese in der Leber erfolgen muss. Das Plasmaalbumin stellt einen Aminosäurenpool dar, der bei Bedarf mobilisiert werden kann (Tothova et al. 2014). Dabei wird die Albuminproduktion gedrosselt und die freiwerdenden Aminosäuren für die Synthese der benötigten APPs genutzt (Ceciliani et al. 2012; Tothova et al. 2014). Außerdem hat Albumin einen hohen Anteil am kolloidosmotischen Druck im Plasma (Ceron et al. 2005; Tothova et al. 2014).

#### 2.1.6.3.2 Transferrin

Transferrin ist in der Lage Eisen reversibel zu binden (Ceron et al. 2005; Tothova et al. 2014). Die Hauptaufgabe besteht im sicheren Eisentransport durch den Körper zur Versorgung der wachsenden Zellen (Huebers & Finch 1987). Ähnlich wie Laktoferrin vermindert Transferrin den Zugang zum Eisen für Pathogene und schränkt somit das Wachstum und die Reproduktionsfähigkeit von Bakterien, Viren und Pilzen ein (Tothova et al. 2014).

### 2.1.6.3.3 Transthyretin (TTR)

Transthyretin (TTR) gehört zur Familie der homotetrametrischen Transportproteinfamilie und hat ein Molekulargewicht von 55kDa (Foss et al. 2005). TTR ist ein thyroxinbindendes Protein, welches in den Transport der Schilddrüsenhormone involviert ist und unterstützt durch Komplexbildung mit dem retinolbindenden Protein den Vitamin A Transport im Plasma (Ingenbleek & Young 1994).

### 2.1.6.4 Akute- Phase- Proteine als Biomarker

#### 2.1.6.4.1 Allgemeines

Der Nutzen von APPs als Biomarker wurde unter zahlreichen entzündlichen und nichtentzündlichen Bedingungen sowohl bei experimentell als auch bei im Felde erkrankten Tieren untersucht (Ceciliani et al. 2012).

Es besteht eine Korrelation zwischen der Leukozytenzahl und verschiedenen positiven APPs wie z.B. CRP, Hp, SAA und Cp (Solter et al. 1991; Giannetto et al. 2012). Abhängig vom Biomarker bzw. der jeweiligen Erkrankung können die entsprechenden APPs als Entzündungsmarker einige Vorteile gegenüber herkömmlichen Verfahren wie der Leukozytenzählung bieten (Solter et al. 1991). So ist beispielsweise die Sensitivität von Hp und Cp deutlich höher als die der Leukozytenzählung (Solter et al. 1991). Daher sind die APPs auch zur Detektion subklinischer Erkrankungen oder zur Vorhersage einiger Erkrankungen geeignet (Kajikawa et al. 1999; Ceron et al. 2005). Wegen der vielen möglichen Ursachen einer APP- Erhöhung ist die Spezifität allerdings gering (Ceron et al. 2005; Tothova et al. 2014). Ein weiterer Vorteil ist die gute Lagerstabilität. So können auch aus gefrorenen Serumoder Plasmaproben noch Messungen durchgeführt werden (Solter et al. 1991). Außerdem korreliert das APP- Level mit der Schwere der Erkrankung (Heegaard et al. 2000; Ganheim et al. 2003; Murata et al. 2004; Ceciliani et al. 2012).

#### 2.1.6.4.2 Akute- Phase- Proteine bei Mastitis

Trotz weltweiter Bemühungen in der Mastitisbekämpfung bleibt diese Erkrankung die wirtschaftlich bedeutendste im Milchviehbetrieb (Tothova et al. 2014). Daher wird die wichtigste Anwendung der APP- Analytik in der Erkennung und dem Monitoring der bovinen

Mastitis, insbesondere im subklinischen Bereich gesehen (Ceciliani et al. 2012). Verschiedene Wissenschaftler haben die körpereigene Synthese von APPs und den Nutzen deren Analyse sowohl bei experimentell infizierten als auch bei unter Feldbedingungen erkrankten Tieren untersucht (Tothova et al. 2014). So konnten beispielsweise in einer Studie bei an Mastitis erkrankten Kühen erhöhte Konzentrationen an SAA gemessen werden (Baydar & Dabak 2014). In einer anderen Studie wurde neben der SAA- Messung auch der Nutzen einer Hpund CRP- Messung als Ergänzung zur Bestimmung der somatischen Zellen untersucht (Thomas et al. 2015). Erhöhte Laktoferrinwerte in der Milch konnten in Zusammenhang mit der Vorhersage von Lahmheit und einem erhöhten Risiko für vorzeitiges Abgehen gebracht werden (van Altena et al. 2016).

#### 2.1.6.4.3 Akute- Phase- Proteine im peripartalen Zeitraum

Die Nützlichkeit der Kontrolle der APPs konnte für einige reproduktionsassoziierte Erkrankungen und die Überwachung des peripartalen Zeitraumes gezeigt werden (Tothova et al. 2014). So wurde beispielsweise nachgewiesen, dass die Haptoglobinkonzentration um den Geburtszeitpunkt herum ihren Höhepunkt erreicht, vor und nach der Geburt also niedrigere Konzentrationen vorliegen (Uchida et al. 1993). Andererseits konnte ein Anstieg der Konzentrationen von Hp und SAA bei Kühen nach der Geburt beobachten werden (Tothova et al. 2008). Auch erhöhte Ceruloplasminwerte konnten in diesem Zeitraum (0-1 Woche post partum) festgestellt werden, diese wurden jedoch als physiologisch eingeordnet (Hussein & Staufenbiel 2011; Hussein 2012). In einer weiteren Studie waren verschiedene Proteine wie Cp, Hp, AGP und Albumin im peripartalen Zeitraum Gegenstand der Untersuchung (Reis et al. 2016). Im Vergleich zwischen klinisch gesunden und postpartal erkrankten Tieren konnten bei den erkrankten Tieren signifikant höhere Hp- Konzentrationen festgestellt werden (Chan et al. 2010).

### 2.1.6.4.4 Akute- Phase- Proteine bei gastrointestinalen Erkrankungen

Auch hinsichtlich abdominaler Erkrankungen wurde der diagnostische Nutzen der APPs evaluiert. Beispielsweise erfolgte in einer Studie eine Untersuchung von Kühen mit Labmagenverlagerung, Retikuloperitonitis und traumatischer Perikarditis. Dabei wurden auch prä- und postoperative Fibrinogen- und Haptoglobinwerte erfasst. Die untersuchten APPs sind nicht geeignet, den Erfolg einer Operation vorherzusagen, allerdings eignen sie sich zum

postoperativen Monitoring von Infektionen (Hirvonen & Pyorala 1998). Außerdem kann die Haptoglobinkonzentration zur Differenzierung zwischen traumatischer Retikuloperitonitis und anderen gastrointestinalen Erkrankungen genutzt werden (Hirvonen & Pyorala 1998). Hp, SAA, AGP und Fb waren in einer anderen Untersuchung bei an Retikuloperitonitis erkrankten Kühen signifikant erhöht (Baydar & Dabak 2014).

#### 2.1.6.4.5 Akute- Phase- Proteine bei Lahmheiten

Der Nutzen der APP- Bestimmung wurde ebenfalls bei lahmen Kühen untersucht. Beispielsweise konnten bei lahmenden Kühen höhere SAA- und Hp- Konzentrationen als bei gesunden Tieren festgestellt werden (Nazifi et al. 2012). In einer anderen Studie wurden verschiedene APPs zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt, um bei Rindern mit Gliedmaßenerkrankungen den Therapieerfolg evaluieren zu können. Dabei traten die höchsten Konzentrationen an SAA, Hp und Fibrinogen zu Beginn der Therapie auf (Jawor et al. 2008). Bei den Tieren, bei denen die Behandlung ohne Komplikationen verlief, konnte ein steter Abfall der APPs verzeichnet werden (Jawor et al. 2008). Hp wurde in einer weiteren Studie als ein Indikator für die Schmerzhaftigkeit von Lahmheiten ermittelt (Tadich et al. 2013).

### 2.1.6.4.6 Akute- Phase- Proteine bei metabolischen Erkrankungen

Milchkühe können im peripartalen Zeitraum an verschiedenen metabolischen Störungen wie z.B. Lipomobilisationssyndrom oder subakuter Pansenazidose leiden (Tothova et al. 2014). Eine in diesem Zeitraum ebenfalls häufig auftretende Erkrankung ist die Ketose. Von dieser Erkrankung betroffene Kühe zeigten in einer Untersuchung eine Aktivierung des angeborenen Immunsystems und Veränderungen im Kohlenhydrat- und Lipidmetabolismus (Zhang et al. 2016). Verglichen mit der Kontrollgruppe hatten an Ketose erkrankte Rinder höhere Serumkonzentrationen an \(\mathcal{G}\)- Hydroxybuttersäure, IL- 6, TNF, SAA und Laktat (Zhang et al. 2016). Insbesondere IL-6 und Laktat könnten als prädiktive Biomarker zum frühzeitigen Erkennen der Ketose genutzt werden (Zhang et al. 2016). In einer anderen Studie bei Milchkühen wurden erhöhte Werte an SAA und Hp in Verbindung mit subakuter Pansenazidose festgestellt (Khafipour et al. 2009). Dem entgegen traten in einer weiteren Untersuchung bei Tieren mit subakuter Pansenazidose zwar erhöhte Konzentrationen an SAA, nicht aber an Hp und Fibrinogen auf (Gozho et al. 2007). Zu beachten ist dabei jedoch, dass Tiere im peripartalen Zeitraum grundsätzlich Veränderungen in der Homöostase und

physiologischen Herausforderungen unterliegen, die zu einer Aktivierung des Immunsystems und gleichzeitigem Auftreten einer Entzündungsantwort führen können (Tothova et al. 2014).

#### 2.1.6.4.7 Akute- Phase- Proteine bei Kälbern

Bei Kälbern wurde der Schwerpunkt der Untersuchungen der APPs auf die Erkrankungen der Atemwege gelegt, da diese die Hauptursache für Morbidität und Mortalität darstellen (Tothova et al. 2014). Eine weitere multifaktorielle Erkrankung, die ernsthafte Auswirkungen auf den Bestand haben kann, ist die Kälberdiarrhoe (Tothova et al. 2014). Beispielsweise wurden an Pneumonie, Enteritis oder Pneumoenteritis erkrankte Tiere mit Tieren einer Kontrollgruppe aus gesunden Kälbern verglichen. Zielgrößen waren dabei unter anderem die Konzentrationen an IL-1β, IL-6, TNF-α und SAA. Bei den erkrankten Kälbern waren die ermittelten Konzentrationen an IL-1β, IL-6, TNF-α und SAA signifikant höher als in der Kontrollgruppe (Kabu et al. 2016). Die Bestimmung der genannten Marker wird von den Autoren als vorteilhaft hinsichtlich der Beurteilung der Schwere der Erkrankung, der Auswahl der geeigneten Therapie, der Überwachung des Therapieerfolges und zum Nachweis subklinischer Erkrankungen gesehen (Kabu et al. 2016). Auch erhöhte Hp- und Fibrinogenkonzentrationen wurden bei Atemwegserkrankungen gefunden (Seppa-Lassila et al. 2015). Bei Kälbern mit milden Zeichen einer Eimeriose traten vermindere Hp- und erhöhte Fibrinogenkonzentrationen auf. Die SAA- Bestimmung erwies sich jedoch in dieser Studie nicht als nutzbringend (Seppa-Lassila et al. 2015). Andere Autoren fanden weniger konkrete Ergebnisse. In einem durchgeführten Review zur Untersuchung der Genauigkeit der APPs zur Diagnose boviner Atemwegserkrankungen wurde festgestellt, dass sich auf der Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse keine Rückschlüsse ziehen lassen (Abdallah et al. 2016).

#### 2.1.6.4.8 Akute- Phase- Proteine bei Stress

Auch der Nutzen der APPs hinsichtlich der Beurteilung der allgemeinen Gesundheit und der Auswirkungen von Stress auf die Rinder wurde bereits von mehreren Autoren untersucht (Tothova et al. 2014). Eindeutige Zusammenhänge herzustellen ist jedoch weiterhin schwierig, insbesondere auch, weil Variablen wie Rasse, Geschlecht und individuelles Temperament eine Rolle spielen (Carroll & Sanchez 2014; Hughes et al. 2014).

### 2.2 Diagnostik

### 2.2.1 Allgemeines

Die Diagnostik der kupferabhängigen Erkrankungen ist sehr komplex. Es gibt keinen einzelnen Test, der allein Tiere identifizieren kann, bei denen eine Kupfersupplementierung einen ökonomischen Vorteil ergibt (Laven & Livesey 2005; Laven et al. 2007), bzw. um Tiere zu finden, die von einer Supplementierung profitieren können. So ist es in vielen Fällen hilfreich, Kupfer zu supplementieren und zu überprüfen, ob sich am Krankheitsbild oder den Produktionsleistungen etwas verändert (Laven & Livesey 2005). Allerdings ist die bloße Supplementierung nicht angezeigt (Laven & Livesey 2005). Um Veränderungen beurteilen zu können, ist die Erhebung eines Status quo nötig (Laven & Livesey 2005). Es sollte also vor der Supplementierung mit Kupfer eine gründliche Untersuchung des Problems erfolgen (Laven & Livesey 2005). Die Diagnostik besteht aus drei Säulen (Suttle 2010). Hinweisend ist die Suche nach klinischen Symptomen oder subklinischen Erscheinungen wie verminderter Leistung (Suttle 2010). Anschließend sollten diese durch labordiagnostische Werte untermauert werden (Vermunt & West 1994; Suttle 2010). Hierzu dienen eine Rationskupferbestimmung und eine Plasmakupferbestimmung. Außerdem sollte, wenn möglich, auch ein Leberkupferstatus erhoben werden (Vermunt & West 1994; Laven & Livesey 2005). Die Kupfersupplementierung ist demnach der letzte und nicht der erste Schritt der Aufarbeitung des Problems (Vermunt & West 1994; Laven & Livesey 2005). Es sollte weiterhin nur ein Teil der Herde supplementiert werden, um den Erfolg, insbesondere auch den ökonomischen Erfolg der Supplementierung bewerten zu können (Laven & Livesey 2005; Suttle 2010) (Kosten-Nutzen-Analyse). Ratsam ist die Bestimmung der Kupferversorgung auf Herden- und nicht auf Einzeltierbasis (Vermunt & West 1994).

### 2.2.2 Blut

Die Blutprobenuntersuchung ist die verbreitetste Methode zur Erhebung der Kupferversorgung (Laven & Livesey 2006). Neben der Bestimmung der Serum- und Plasmakupferkonzentrationen wird auch die Bestimmung der Ceruloplasminaktivität oder die Aktivität anderer kupferhaltiger Enzyme zur Evaluierung des Kupferstatus genutzt. Dabei kann die Kupferbestimmung im Blut ebenfalls nur einen Hinweis auf das Vorliegen eines Mangels geben (Laven & Livesey 2006). So können auch in einer Mangelsituation durch die Entspeicherung der Leber normale Blutkupferwerte vorliegen und einen bestehenden Mangel

verschleiern (Du et al. 1996; Underwood & Suttle 1999; Smith et al. 2010). Wenn die Plasmakupferkonzentrationen unter dem Referenzbereich liegen, ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass die Tiere bereits unter einem subklinischen Mangel leiden (Underwood & Suttle 1999). Dennoch wird die Messung der Plasmakupferkonzentration bei schon bestehenden klinischen Zeichen eines Mangels als beste Methode zur Bestätigung eines Kupfermangels angesehen (Underwood & Suttle 1999). Im Blut gibt es zwei Kupferpools (Laven & Livesey 2005). Kupfer ist sowohl in den Erythrozyten als auch im Plasma enthalten (Laven & Livesey 2005). Im Plasma liegt Kupfer vor allem an Ceruloplasmin gebunden vor. Es kann aber auch in anderen Enzymen enthalten sein. Außerdem liegt es in Verbindung mit Proteinen und Aminosäuren vor (Paynter 1982). Dabei spiegeln die Vollblutkupferwerte, insbesondere die Erythrozytenkupferkonzentrationen wegen der im Vergleich zu den Plasmaproteinen relativ höheren Lebensdauer, eher die historische Kupferversorgung wider (Laven & Livesey 2006; Suttle 2010). Die Plasmakupferwerte stellen dagegen eher den aktuellen Stand dar (Suttle 2010). Dieser Unterschied könnte diagnostisch genutzt werden (Laven & Livesey 2005). Während der frühen Entspeicherungsphase bleiben der Leber die Plasmakupferkonzentrationen bei sinkenden Leberkupferwerten konstant (Underwood & Deswegen ist es möglich, dass Rationen, die nicht ausreichend Kupfer enthalten, verfüttert werden und gleichzeitig normale Plasmakupferwerte vorhanden sind (Laven & Livesey 2005).

In Tabelle 2 sind die Referenzbereiche einiger Autoren für die Kupferkonzentration im Blut angegeben.

Tabelle 2: Referenzbereiche für die Kupferkonzentration im Blut in µmol/ I

Defizitär	Marginal	Adäquat	Toxisch	Autor					
	Serum								
<7,9*		11-20,5*	>78,7*	(Maas 1987)					
<9*				(Naylor et al. 1989)					
		16-32		(Bickhardt 1992)					
		>7,6*		(Suttle 1993)					
		7,9-17,9*		(Vermunt & West 1994)					
		5,16-5,54		(Kaneko 1997)					
		12-24		TiHo aus (Öhlschläger 2006)					
	8*			(Laven et al. 2007)					
		7,5-18		(Ouweltjes et al. 2007)					
		8-19*		(Spolders et al. 2010)					

Fortsetzung Tabelle 2								
		9,4-17,3*		(Herdt & Hoff 2011)				
		$7,1 - 17,3^{*EW}$		(Heggemann 2014)				
		$7,7 - 15,1^{*PW}$						
		14,2 – 18,9*		(laboklin 2016)				
		12,5 - 32,8*		(vetmed.uni-Leipzig 2016)				
			Plasma					
<7,9*		11-20,5*	>78,7*	(Maas 1987)				
0,9-8,7	0,55-0,7	0,8-1,2		(Smart et al. 1992)				
<3,9*		>9,4*		(Suttle 1993)				
		12,6-18,9		(Rossow 1994)				
<8	8-12	12-23	>23	(Mackenzie 1996)				
<7,1*				(Gelfert & Staufenbiel 1998)				
<3,1*	7,9-11*	11-14,2*	>18,9*	(Kincaid 1999)				
			50,4-322,7*	(Bidewell et al. 2000)				
		12-20		(Dirksen 2006)				
		8-32,8		(Fürll 2013)				
		10,1- 20,9*EW		(Heggemann 2014)				
		10,9- 19,0*PW						
			Vollblut					
		10,5*		(Suttle 1993)				
7,7-8,8*	9,4-10,7*	10,7-19,4*		(Rogers 1996)				
		7,6 - 17,6*EW		(Heggemann 2014)				
		$8,6-16,5^{*PW}$						

<sup>\*</sup> Werte auf µmol/ I umgerechnet und gerundet EW: Einzelwert; PW: Poolwert

Referenzbereiche für Ceruloplasmin in Serum und Plasma sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Referenzbereiche für Ceruloplasmin im Blut

Defizitär	Marginal	Adäquat	Medium	Autor
0-80 mg/ l	90-120 mg/ l	130-250 mg/ l	S	(Puls 1988)
	<15 IU/ I		S	(Laven et al. 2007)
		88-334 mg/ l	S	(Hussein 2012)
		15-68 IU/ I	Р	(Laven et al. 2007)
		143-459 mg/ l	Р	(Hussein 2012)

S: Serum; P: Plasma

### 2.2.3 Leberproben, Nierenproben

Die Leber ist das Hauptkupferspeicherorgan (Laven & Livesey 2005; Laven et al. 2007). Wenn Rinder eine Ration mit ungenügender Kupferkonzentration erhalten, kommt es zu einer progressiven Reduktion des Leberkupfergehaltes (Underwood & Suttle 1999). Daher ist eine Leberbiopsie die zuverlässigste Methode, den Kupfervorrat und die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Kupferhomöostase zu bestimmen (Puls 1988; Laven & Livesey 2005; Laven Balemi 2010). Allerdings beschreibt et al. 2007: et al. Leberkupferkonzentration nicht notwendigerweise den funktionellen Kupferstatus (Laven et al. 2007). Solange der Speicherpool der Leber nicht erschöpft ist, kann der Plasmakupferspiegel in der Regel auch in einer Mangelsituation im Referenzbereich gehalten werden (Herdt & Hoff wird Leberkupfergehalt 2011). Außerdem der durch physiologisch variable Bedarfsanforderungen, z.B. während der Trächtigkeit, beeinflusst (Kincaid 1999; Herdt & Hoff 2011). Hinzu kommt, dass die Leberbiopsie ein invasiver Eingriff ist (Laven et al. 2007). Zusätzlich sind die Probennahme und die Kupferbestimmung relativ teuer in der Durchführung (Laven et al. 2007). Weiterhin ist es möglich, dass die verschiedenen Leberlappen unterschiedliche Kupferkonzentrationen enthalten (Puls 1988; Laven & Livesey 2005). Diese Unterschiede sind allerdings zu gering, um dadurch zu einer Fehldiagnose zu gelangen (Laven & Livesey 2005). Leberbiopsien von Schlachtkörpern eignen sich, den Erfolg eingeleiteter Maßnahmen zu überprüfen (Laven & Livesey 2005). Bezüglich einer Kupferintoxikation kann die Leberbiopsie über das Ausmaß des bereits angesammelten Kupfers Auskunft geben (Laven & Livesey 2004).

Eine Kupferakkumulation in der Rinderniere ist im Unterschied zu einer Kupferanreicherung in der Leber immer pathologisch (Laven & Livesey 2004). Daher ist hinsichtlich der Diagnose einer Kupferintoxikation die Bestimmung der Nierenkupferkonzentration der Bestimmung des Leberkupfergehaltes überlegen (Laven & Livesey 2004).

In den Tabellen 4 und 5 sind Referenzbereiche für die Kupferkonzentration in der Leber bzw. der Niere angegeben.

Tabelle 4: Referenzbereiche für die Leberkupferkonzentration in mg/ kg TM

Mangelhaft	Marginal	Adäquat	Hoch	Toxisch	Autor
<25		100-300			(Ammerman 1970)
<5					(Smith & Coup 1973)
0.5-10.0	5.0-25.0	25-100	200-550	250-800	(Puls 1988)
3,5-35	17,5-70	87,5-525			(Smart et al. 1992)
		>22			(Vermunt & West 1994)
<6	6-20				(Underwood & Suttle 1999)
< 33	33-125	125-600		>1250**	(Kincaid 1999)
				>508*	(Bidewell et al. 2000)
		>30-350			(Dirksen 2006)
<25	25-100	100-600		>800	(Ouweltjes et al. 2007)
<22		22,3-118		>940	(Grace et al. 2010)
				(Gefahr)	
		50-600			(Herdt & Hoff 2011)
		30-350			(Fürll 2013)
		106 – 901			(Heggemann 2014)

<sup>\*</sup>umgerechnet auf mg/ kg TS und gerundet

Tabelle 5: Referenzbereiche für die Kupferkonzentration in der Niere in mg/ kg TM

Defizient	Marginal	Adäquat	Hoch	Toxisch	Autor
1.0-5.0	3.0-5.5	4.0-6.0	5.0-7.0	10-122	(Puls 1988)
				>41,3*	(Bidewell et al. 2012)

<sup>\*</sup>umgerechnet auf mg/ kg TM und gerundet

<sup>\*\*</sup> die Werte für den toxischen Bereich scheinen variabel zu sein und müssen weiter untersucht werden (Anmerkung des Autors)

### 2.2.4 Leberenzyme

Bei der toxischen Kupferakkumulation kommt es zu einer Leberdegeneration, bei der Leberzellen zerstört und Leberenzyme frei werden. Eine Hepatopathie kann bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome durch eine Leberenzymbestimmung erkannt werden (Laven & Livesey 2004). Einschränkend gilt, dass Hepatopathien in der modernen Milchkuhhaltung weit verbreitet sind, aber nicht kupferinduziert sein müssen (Laven & Livesey 2004). Die Glutamatdehydrogenase (GLDH) wird beim Rind als leberspezifisches Enzym angesehen (Laven & Livesey 2004). Die Aspartat- Aminotransferase ist aufgrund ihrer geringen Spezifität nicht geeignet (Laven et al. 2004).

### 2.2.5 Kupfer im Haar

Das Haarkleid kann durch sein Erscheinungsbild Hinweise auf eine kupferabhängige Erkrankung geben. Zu beachten ist, dass nicht nur Kupfer einen Einfluss auf das Aussehen des Fells hat (Suttle 2010).

Auch der Kupfergehalt des Haares kann ermittelt werden. Verglichen mit Plasma- und Leberkupfergehalten sinkt die Kupferkonzentration in einer Haarprobe unter einer Mangelsituation deutlich langsamer (Suttle & Angus 1976). Die Haarfarbe hat nur einen geringen Effekt auf die Kupferkonzentration (Puls 1988; Suttle 2010). Außerdem kann eine Haarprobe als post mortem Diagnostikum genutzt werden (Suttle 2010). Eine Bestimmung der Mineralienwerte aus dem Haar ist nach Kincaid (1999) nicht geeignet, da es an Referenzwerten mangelt, die Werte zu langsam auf das aufgenommene Futter reagieren und die Proben leicht kontaminiert werden können. Außerdem spiegeln Haarproben die Kupferaufnahme über die Ration erst bei einer Leberkupferkonzentration von unter 20 ppm Feuchtmasse wider (Puls 1988). Referenzbereiche für die Haarkupferkonzentration von Rindern sind in der Tabelle 6 wiedergegeben.

Tabelle 6: Referenzwerte für die Kupferkonzentration im Haar in mg/ kg TM

Mangelhaft	Marginal	Adäquat	Autor
1,0-6,7	4,3-8,3	6,7-32	(Puls 1988)
		6,6-10,4	(Dirksen 2006)
		6,9 - 39,9	(Heggemann 2014)

### 2.2.6 Rationskupfer

Der Kupfergehalt der Ration wird von vielen Landwirten schlecht kontrolliert, obwohl sie Kupfer supplementieren. Da die Bioverfügbarkeit des Kupfers in der Ration stark von der komplexen Interaktion des Kupfers mit anderen Rationsbestandteilen abhängt, ist eine bloße Rationskupferbestimmung nicht geeignet, um den Grad der Kupferversorgung zu ermitteln (Laven & Livesey 2005). Weiterhin ist zu beachten, dass eine Rationsanalyse nur eine Momentaufnahme der Mineralstoffversorgung sein kann, da die Futtergewinnung saisonalen und geografischen Einflüssen unterliegt (Laven & Livesey 2005). Idealerweise sollte die Diät außerdem auf den Gehalt an Molybdän, Eisen und Schwefel untersucht werden (Kincaid 1999; Laven & Livesey 2005). Sofern das Wasser aus einem Brunnen gewonnen wird, ist es zudem sinnvoll dessen Eisen- und Schwefelgehalt zu bestimmen (Laven & Livesey 2005). Dabei kann der Cu: Mo Quotient einen Hinweis auf einen eventuellen Mangel oder kupferbedingte Probleme geben. Ein Quotient von kleiner als 3:1 weist auf einen möglichen Mangel hin, ein Quotient unter 1:1 zeigt ein hohes Risiko für kupferabhängige Probleme an (Laven & Livesey 2005). Auch ein Fe: Cu Quotient größer 100 bedeutet ein hohes Risiko für eine Eisen- Kupfer-Interaktion (Underwood & Suttle 1999). Außerdem hängt die Entstehung klinischer Symptome von den Kupferreserven und dem Produktionsstatus der Tiere ab (Laven & Livesey 2005). So können beispielsweise Fruchtbarkeitsprobleme durch eine Ration verursacht worden sein, die schon vor 100 Tagen gefressen wurde (Laven & Livesey 2005). Die Rationsanalyse kann demnach nur einen Baustein der Problemanalyse bilden (Laven & Livesey 2005).

Der Kupferbedarf ist von verschiedenen Variablen wie beispielsweise der Rasse, dem Laktationsstatus und der Absorbierbarkeit des Kupfers aus dem Futter abhängig (Suttle 2010). Insbesondere die Absorptionsrate aus dem Futtermittel unterliegt wiederum großen Unterschieden und ist z.B. abhängig vom Schwefel- und Molybdängehalt (Suttle 2010).

### 2.2.7 Besonderheiten der Diagnostik

Bei den meisten Säugern gibt es keinen Unterschied zwischen der Serum- und Plasmakupferkonzentration (Louro et al. 1989; Underwood & Suttle 1999). Allerdings erfolgt bei Schafen und Rindern eine Bindung von Kupfer im Gerinnsel in der frühen Phase der Gerinnung (McMurray 1980; Paynter 1982; Laven & Livesey 2006; Suttle 2010). Ein möglicher Grund ist eine Beteiligung des Ceruloplasmins an der Gerinnungskaskade aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu den Gerinnungsfaktoren V und VIII und somit einer Reaktion mit

dem Protein C (Walker & Fay 1990). Verschiedene Autoren berichten bei gepaarten Proben über eine signifikant geringere Kupferkonzentration (Laven & Livesey 2006; Laven & Livesey 2007; Herdt & Hoff 2011) bzw. Ceruloplasminaktivität in Serum- verglichen mit Plasmaproben (Paynter 1982; Blakley & Hamilton 1985; Kincaid et al. 1986; Laven et al. 2007; Suttle 2010; Hussein & Staufenbiel 2011). Über das Ausmaß dieser Abweichungen gibt es unterschiedliche Angaben. Verschiedene Quellen berichten, dass Ceruloplasmin allein im Gerinnsel zurückbleibt, während andere Kupferquellen unbeeinflusst bleiben (Paynter 1982; Underwood & Suttle 1999). Nach Laven et al. (2008) hingegen lässt sich der Unterschied zwischen Serum und Plasma nicht ausschließlich auf die Bindung des Ceruloplasmins zurückführen. Serumund Plasmakupferkonzentrationen sowie Ceruloplasminaktivitäten können nicht einfach in einander umgewandelt werden (Laven et al. 2007). Der Einsatz eines Umrechnungsfaktors wäre nur korrekt, wenn der Verlust während der Gerinnung in einem genügend kleinen Bereich schwankt (Laven et al. 2007). Allerdings sind die Schwankungen zu groß, so dass der Einsatz eines Umrechnungsfaktors nicht in Betracht gezogen werden kann (Paynter 1982; Laven et al. 2007). Das Ausmaß des Kupferverlustes während der Gerinnung hängt nicht vom Ausgangskupferwert ab (Laven & Livesey 2006; Laven et al. 2007). Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur (Kincaid 1999; Laven & Livesey 2006), Art des Probengefäßes und Kontaktumfang mit dessen Stopfen haben keinen wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß des im Gerinnsel gebundenen Kupfers (Paynter 1982). Auch Laktationsstatus und saisonale Unterschiede bei der Probennahme haben keinen Effekt auf den Verlust während der Gerinnung (Laven et al. 2007). In dieser Studie konnte der Faktor "Herde" als einzige signifikante Variable ermittelt werden.

Ceruloplasmin kann als Hauptkupferquelle des Plasmas angesehen werden. Daher gehen erhöhte Ceruloplasminwerte normalerweise auch mit erhöhten Plasmakupferwerten einher (Cousins 1985). Wie bereits oben beschrieben, liegen bei Entzündungen erhöhte Werte des positiven APPs Ceruloplasmin vor. Dieser Umstand sollte bei der Erhebung des Kupferstatus berücksichtigt werden. Somit muss je nach Fragestellung zwischen einem physiologischen Anstieg, beispielsweise postpartal und einem Anstieg infolge eines pathologischen Prozesses unterscheiden werden.

### 2.2.8 Abhängigkeiten zwischen den Messgrößen

Zur Diagnose kupferabhängiger Erkrankungen haben verschiedene Autoren die Kupferkonzentrationen in unterschiedlichen Medien wie beispielsweise Serum, Plasma, Vollblut, Leber- und Nierengewebe bestimmt. Auch Ceruloplasminaktivitäten wurden

insbesondere in Serum- und Plasmaproben gemessen. Eine Vielzahl von Wissenschaftlern ermittelte auch Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Größen. Dabei zeigte sich insgesamt ein eher uneinheitliches Bild. Es gilt außerdem zu unterscheiden, ob einzelne Tiere, Gruppen oder ganze Herden zur Berechnung herangezogen werden. So konnte in einer Studie auf der Grundlage der Mittelwerte der Serum- und Plasmakupferkonzentrationen verschiedener Herden ein Korrelationskoeffizient von 0,91 errechnet werden, während die Werte auf Einzeltierbasis nicht in einander umwandelbar sind (Laven et al. 2007). Weiterhin wurde herausgefunden, dass die Bestimmung der Serumkupferkonzentration wegen der hohen individuellen Gerinnungsverluste kein adäquater Ersatz zur Plasmakupferbestimmung ist, um Tiere mit dem Status marginal zu ermitteln (Laven et al. 2007). Es eignet sich allenfalls die Bestimmung der Plasmaceruloplasminaktivität zu diesem Zweck (Laven et al. 2007). Es konnte ein Korrelationskoeffizient von 0,95 bzw. 0,99 ermittelt werden (Kincaid et al. 1986). Nach Kincaid et al. (1986) können Serumwerte also sehr wohl als Ersatz für die Bestimmung aus den Plasmawerten Verwendung finden. Setzt man Leberkupferkonzentrationen und Blutkupferwerte ins Verhältnis, ist außerdem zu beachten, dass sich Blutwerte erst bei einer Leberkupferkonzentration unter 40 mg/ kg TM bzw. 30 mg Cu/ kg TM verändern (Mills 1987; Wikse et al. 1992). In einer anderen Studie wurde festgestellt, dass gemessene Plasmakupferwerte bei einer Leberkupferkonzentration unter 40 mg/ kg TM sehr variabel waren (Claypool et al. 1975). Allerdings waren in dieser Untersuchung nur vier Prozent der Plasmakupferwerte unter 0,5 µg/ ml mit Leberkupferkonzentrationen über 40 mg/ kg assoziiert. Demnach können niedrige Plasmakupferwerte auf verminderte Leberkupferwerte hinweisen. In Tabelle 7 sind Korrelationskoeffizienten für verschiedene Medien veranschaulicht.

Tabelle 7: Korrelationskoeffizienten verschiedener Messgrößen in unterschiedlichen Medien

	SCp:				Autor
PCu	SCu	EDTA	LCu		
		Ср			
	0,99				(Paynter 1982)
	0,83		0,35		(Blakley & Hamilton 1985)
0,91	0,90				(Kincaid et al. 1986)
			-0,09		(Lopez-Alonso et al. 2006)
0,46	0,45				(Laven & Livesey 2007)
	0,87; 0,94;				(Suttle 2008)
	0,85; 0,87;				
	0,93; 0,96;				
	0,87; 0,94				
	0,51				(Laven et al. 2008)
0,46	0,52				(Hussein & Staufenbiel 2011)
		0,75			(Hussein 2012)
		Ср:			
PCu	SCu	SCp	EDTA	LCu	
0,99					(Paynter 1982)
0,60					(Blakley & Hamilton 1985)
0,50	0,50	0,64			(Kincaid et al. 1986)
				0,95	(Legleiter & Spears 2007)
0,92					(Laven et al. 2008)
0,62					(Hussein & Staufenbiel 2011)
		0,82	0,73		(Hussein 2012)
	Cu:	VB:			
PCu	LCu	LCu			
0,83					(McMurray 1980)
0,98; 0,95;					(Kincaid et al. 1986)
0,99					
	0,14	0,27			(Lopez-Alonso et al. 2006)
0,60; 0,52					(Laven & Livesey 2006)
0,72					(Laven & Livesey 2007)
0,33					(Hussein & Staufenbiel 2011)

SCp: Cp im Serum; PCp: Cp im Plasma; EDTACp: Cp in EDTA- Blut; SCu: Cu im Serum;

PCu: Cu im Plasma; LCu: Cu in Lebergewebe; VB: Vollblut

# 2.2.9 Verfahren zur Bestimmung der Ceruloplasminaktivität

Bisher wurden zahlreiche Verfahren zur quantitativen Ceruloplasminbestimmung beschrieben. Die bedeutendsten Methoden basieren auf der Nutzung der Diaminoxidasefähigkeit des Cp (Schosinsky et al. 1974). Dabei wurden verschiedene Substrate eingesetzt. So haben

Sunderman und Nomoto (1970) p- Phenylendiamin und p- Phenylendiamin- dihydrochlorid gegeneinander verglichen und nutzen Letzteres für ihr Messverfahren. Dimethyl- p-Phenylendiamin- dihydrochlorid und p- Phenylendiamine- dihydrochlorid wurden in einer anderen Studie verwendet (Smith & Wright 1974). Auch O- Dianisidin- dihydrochlorid erscheint als geeignetes Substrat (Schosinsky et al. 1974). In einer weiteren Untersuchung wurde eine ganze Vielzahl von Substraten unter verschiedenen Bedingungen getestet (Young & Curzon 1972). Die genannten Autoren erfassten den Substratumsatz durch spektrophotometrische Messung der Farbveränderung (Sunderman & Nomoto 1970; Young & Curzon 1972; Schosinsky et al. 1974; Smith & Wright 1974). Auch eine chromatografischspektrometrische Methode unter Verwendung der Farbe des Cp wurde entwickelt (Mills 1987). Nach Korman et al. (2008) kann auch eine nephelometrische Methode zur Cp- Bestimmung genutzt werden, allerdings wird diese nicht näher beschrieben. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Probe zunächst durch Immunoaffinitäts- und Gelpermeationschromatografie zu reinigen und anschließend via Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma auf Ceruloplasmin zu untersuchen (Lopez-Avila et al. 2006). Auch die Verwendung von Immunosensoren wurde beschrieben. Beispielsweise eignet sich ein Immunoassay unter Verwendung von Anti- Ceruloplasmin- Antikörpern und anschließender Ceruloplasmin-Bestimmung mit einem piezoelektrischen Immunosensor (Wang et al. 2004). Ebenfalls möglich ist die Durchführung eines indirekt kompetitiven Immunoassays (Garcinuno et al. kovalenten 2014). Nach der Bindung des Ceruloplasmins an mehrwandige Kohlenstoffnanoröhren und der Zugabe sekundärer Antikörper findet eine amperometrische Messung statt. Ein anderer Ansatz ist die Ceruloplasminbestimmung über seine Ferrooxidase-Aktivität (Winkles et al. 1988; Erel 1998).

Bei den oben genannten Verfahren handelt es sich hauptsächlich um manuelle Methoden. Für die Ceruloplasminbestimmung beim Schwein wurde ein automatisiertes Messverfahren in Anlehnung an die Methode nach Sunderman und Nomoto (1970) entwickelt (Martinez-Subiela et al. 2007). Auch für die Untersuchung beim Hund wird ein ähnliches Verfahren beschrieben (Ceron & Martinez-Subiela 2004).

Eine tabellarische Übersicht über verschiedene Ansätze findet sich in Tabelle 55 im Anhang.

# 2.2.10 Maßeinheit der Ceruloplasminkonzentration/ -aktivität

Die Menge an Ceruloplasmin kann als Konzentration in mg/ I (g/ I) oder als Aktivität in mU/ I (U/ I) angegeben werden.

Aus den gemessenen Extinktionen lässt sich die Ceruloplasminkonzentration wie folgt errechnen:

Cp (g/ l)= 0,752 (Extinktion R2- Extinktion R1) (Sunderman & Nomoto 1970).

Die Enzymaktivität ist definiert als Unit, d. h. diejenige Menge an Enzym, welche unter angegebenen Bedingungen ein Mikromol Substrat pro Minute umsetzt:  $1U = 1 \mu mol/min$  (King & Campbell 1961; Greville 1962).

In einer Untersuchung wurde herausgefunden, dass das Produkt, welches bei der Oxidation von PPD durch Ceruloplasmin entsteht, ein identisches Absorptionsspektrum mit Bandrowski's Base (1,4-Cyclohexadiene-1,4-diamine (pubchem 2017) aufweist (Rice 1962b). Zugrunde gelegt wurde ein modifiziertes Verfahren nach Houchin (1958) bzw. Rice (1960). (1970)Für das Verfahren nach Sunderman und Nomoto gilt, dass Ceruloplasminkonzentration proportional zur Bildung des Oxidationsproduktes ist, sofern der Anteil der nicht- enzymatischen Oxidation berücksichtigt wird. Deswegen wird die Ceruloplasminaktivität in mg/ I und nicht wie üblich in Units ausgedrückt (Hussein & Staufenbiel 2017). Letztlich wurde herausgefunden, dass die Serumceruloplasmin- Aktivität in International Units folgender Formel entspricht:

IU = 349 ( $\Delta$ E) (Rice 1962b).

Dabei steht  $\Delta E$  für die ermittelte Extinktionsdifferenz.

Diese Standardisierungstechnik unter Verwendung von Standardlösungen von Bandrowski's Base ist auf andere veröffentlichte Verfahren für den Assay von Ceruloplasmin anwendbar, die auf der enzymatischen Oxidation von PPD basieren (Rice 1962b).

Zieht man also den Teil der nicht- enzymatischen Oxidation ab bzw. setzt ( $\Delta E$ ) gleich (Extinktion R2- Extinktion R1), dann wäre (Extinktion R2- Extinktion R1)= IU/ 349. Dies in die obige Formel eingesetzt ergibt dann folgenden Ausdruck:

Cp (g/I) = 0.752 (1IU/349), d.h. 1IU = 349 Cp (g/I)/0.752 = 464.1 Cp (g/I).

# 3 Material und Methoden

# 3.1 Betriebe und Probanden

Die Probengewinnung für diese Untersuchung wurde im Rahmen der Bestandsbetreuung durch die Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin durchgeführt. Der Zeitraum der Probensammlung erstreckte sich von 2014 bis 2017. Die beprobten Milchviehbetriebe lagen in Brandenburg, Mecklenburg- Vorpommern, Sachsen, Sachsen- Anhalt und Thüringen. Einige Betriebe wurden auch mehrfach besucht. Indikationen waren Routinebesuche zur Erhebung eines Status quo und zum Erkennen eines möglichen Verbesserungspotentials bis hin zur Lösung spezifischer Bestandserkrankungen.

Die untersuchten Tiere wurden, wie in Tabelle 8 gezeigt, nach Laktationsstatus in vier Gruppen eingeteilt.

Tabelle 8: Untersuchungsgruppen

3-0 Woche a. p.	0-1 Woche p. p.	3-5 Wochen p. p.	15-18 Wochen p. p.
Vorbereitung	Kolostrumperiode	Frühlaktation	Hochlaktation

### 3.2 Proben

#### 3.2.1 Probengewinnung

Die gesammelten Proben sind standardisiert und unabhängig von der Fragestellung gesammelt worden. Die für diese Untersuchung relevanten Serum- und Plasmaproben wurden aus der V./ A. caudalis mediana entnommen. Grundsätzlich war das Ziel, jeweils zehn Tiere jeder Gruppe zu beproben. Die für die Probengewinnung verwendeten Röhrchen sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9: Probengefäße

Serumröhrchen	SE 100/15 PP 10 ml	KABE Labortechnik Gmb			Н
		51588 Nümbre		rech	nt-
		Eisenroth			
Lithium-	Monovette 2 ml LH LH 50 I.U./ ml Ca++	Sarstedt AG	& Co	o. [	D-
Heparin-	balanced	51588 Nümbrecht			
Röhrchen	Monovette 9 ml LH LH 16 I.U./ ml 92x16				
	mm*				

<sup>\*</sup>für die hier gezeigten Daten wurden ausschließlich diese Röhrchen verwendet

## 3.2.2 Probenaufbereitung

Nach einer Ruhezeit von zwei bis vier Stunden erfolgte die Probenverarbeitung. Zur Serumgewinnung wurden die Proben 15 Minuten bei 3500 U/ min bzw. 2328 g zentrifugiert. Die Zentrifugation der Plasmaproben erfolgte für 10 Minuten bei 2400 U/ min bzw. 1095 g. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und davon sowohl Einzel- als auch Poolproben für die spätere Untersuchung hergestellt. Für die Gewinnung der Poolproben wurden gleiche Mengen der Einzelproben in ein gemeinsames Gefäß überführt.

# 3.3 Probenlagerung

# 3.3.1 Allgemeines

Die während der Bestandsbetreuung gesammelten Proben wurden wie unter Punkt 3.2 beschrieben aufbereitet und anschließend bei -20°C eingelagert. Die Lagerung erfolgte in 5 ml Röhrchen (5 ml PP 75x12 mm Sarstedt D- 51588 Nümbrecht).

# 3.3.2 Lagerungsversuch

Zur Überprüfung der Stabilität der Ceruloplasminaktivität unter verschiedenen Probenlagerungsbedingungen wurde ein Lagerungsversuch durchgeführt. Hierzu wurden jeweils zehn Serum- und Plasmaproben von zehn verschiedenen Rindern unter bestimmten

Bedingungen eingelagert. Die Lagerung erfolgte entweder bei Raumtemperatur (20°C), im Kühlschrank bei 8°C oder tiefgefroren bei -20°C. Alle Serum- und Plasmaproben wurden erstmals am Tag der Probensammlung (Messtag 0) bestimmt. Anschließend wurde der Ceruloplasmingehalt der bei Raum- und Kühlschranktemperatur gelagerten Proben an den darauffolgenden sieben Messtagen (Messtage 1- 7) täglich ermittelt. Weitere Bestimmungen erfolgten an Tag 12 und 14 nach der Probensammlung. Mit Hilfe der bei -20°C gelagerten Serum- und Plasmaproben sollte die Beständigkeit gegenüber mehrmaligem Einfrieren und Auftauen überprüft werden. Hierzu wurden die Proben zunächst eingefroren. Am ersten Messtag wurden sämtliche Proben aufgetaut, jedoch nur eine Probe gemessen. Die gemessene Probe wurde anschließend verworfen, die anderen wieder eingefroren. Am nächsten Messtag wurden die verbliebenen Proben erneut aufgetaut und die Ceruloplasminaktivität einer weiteren Probe bestimmt. Die übrigen Proben wurden wieder eingefroren. Dieses Vorgehen wurde insgesamt viermal wiederholt.

Die Stabilität im Zeitverlauf während der Lagerung bei -20°C wurde über die Serum- und Plasmakontrollen (siehe 3.5.1) ermittelt.

Für den Lagerungsversuch fand die automatische Methode Anwendung (siehe 3.4). Bezüglich der Tiefkühllagerung wurden außerdem die Ergebnisse der manuellen Kontrollwerte betrachtet.

# 3.4 Untersuchungsmethode

#### 3.4.1 Allgemeines

Die Bestimmung der Ceruloplasminaktivität wurde über die Oxidation von p- Phenylendiamin in Anlehnung an die Methode nach Sunderman und Nomoto (1970) durchgeführt. Dazu wurden eine 0,2 molare Natriumacetat- Lösung und eine 0,2 molare Essigsäure- Lösung benötigt. Zur Herstellung einer 0,1 molaren Natriumacetat- Pufferlösung wurden 430 ml der 0,2 molaren Natriumacetat- Lösung mit 70 ml der Essigsäure- Lösung und 400 ml Aqua dest. vermischt. Durch Zugabe von Natriumacetat- oder Essigsäure- Lösung erfolgte die Einstellung des pH- Wertes auf 5,45. Anschließend wurde das Gemisch mit Aqua dest. auf 1000 ml aufgefüllt. Zur Herstellung der Substrat- Pufferlösung wurden 0,5 g Phenylendiamin-dihydrochlorid (PPD) in einen Kolben mit 75 ml auf 37°C vorgewärmter Natriumacetat-Pufferlösung gegeben. Nach Einstellen des pH- Wertes auf 5,45 wurde der Substratpuffer mit ebenfalls vorgewärmter Natriumacetat- Pufferlösung auf 100 ml aufgefüllt. Die Einstellung des

pH- Wertes erfolgte hier durch Zugabe von zweimolarer Natriumhydroxid- Lösung. Außerdem wurde eine 1,5 molare Natriumazid- Lösung benötigt. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 10 aufgelistet.

Tabelle 10: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller	
Aqua dest.	AQUA DEST nach VDE 0510	Pharma- Depot- GmbH, D-	
		33775 Versmold	
Essigsäure	Essigsäure 96 % 1.00062.1000	Merck KGaA, D- 64271	
	FMSURE	Darmstadt	
Natriumacetat	AnaLaR NORMAPUR Sodium	VWR Prolabo Chemicals, B-	
	acetate Product 27653.235	3001 Leuvren	
Natriumazid	Natriumazid reinst 1.06688	Merck KGaA, D- 64271	
	0250K22370088604	Darmstadt	
Natriumhydroxid	Natronlauge (2N) 2 mol/ I ROTH	Carl Roth GmbH + Co. KG, D-	
		76185 Karlsruhe	
Phenylendiamin-	1,4 Phenylendiamine	SIGMA- ALDRICH CHEMIE	
dihydrochlorid	dihydrochloride ≥99,0 %	GmbH, D- 89555 Steinheim	

Die Messungen wurden entweder manuell oder automatisiert mit dem Cobas Mira (Roche) durchgeführt.

#### 3.4.2 Manuelle Messung

Für jede Ceruloplasminbestimmung wurden jeweils zwei Reaktionsgefäße benötigt. Dabei diente eines der Bestimmung des Blindwertes (R1), das zweite Röhrchen diente der Bestimmung des Probenwertes (R2). Zunächst wurden jeweils beide Röhrchen mit 2000 µl der 0,1 molaren Natriumacetat- Pufferlösung befüllt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl der Serum- bzw. Plasmaprobe. Nach einem Mischvorgang wurden die Gefäße in ein Wasserbad verbracht. Dort erfolgte bei 37°C für mindestens 5 Minuten eine Temperaturangleichung. Im Anschluss wurden beiden Röhrchen 1000 µl der ebenfalls auf 37°C eingestellten PPD- Pufferlösung hinzugegeben. Es folgte ein weiterer Mischvorgang und die Reagenzgefäße wurden wieder in das abgedunkelte Wasserbad verbracht. Von nun an war die Behandlung beider Röhrchen unterschiedlich. Nach fünf Minuten Inkubationszeit

wurden R1 50 µl einer 1,5 molaren Natriumazid- Lösung zugesetzt. Anschließend wurde erneut gemischt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit wurden auch R2 50 µl der Natriumazid- Lösung zugegeben. Es erfolgte ebenfalls ein Mischvorgang. Im Anschluss daran wurde der Inhalt der Reaktionsgefäße jeweils in eine Küvette überführt und die entsprechende Extinktion am Photometer bei einer Wellenlänge von 534 nm ermittelt. Der Ablauf der manuellen Messung ist in Tabelle 11 veranschaulicht.

Tabelle 11: Ablauf der manuellen Messung

Behandlung	Blindwert R1	Probenwert R2					
Zugabe von 0,1 mol/ l Natriumacetat- Pufferlösung 2000 μl							
	Zugabe Probe 100 μl						
Mischen und Temperati	ur auf 37°C einstellen (Wasserb	oad für mind. 5 Minuten)					
Zugal	be PPD- Pufferlösung (37°C) 10	000 μΙ					
Inkubieren (Wasserbad) 5 Minuten Kontinuierlich							
Zugabe 50 µl 1,5 mol/ l	Ja	Nein					
Natriumazid- Lösung	+ Mischen	(wurde mitgemischt)					
Inkubi	eren (Wasserbad) weitere 30 M	linuten					
Zugabe 50 µl 1,5 mol/ l	Nein	Ja					
Natriumazid- Lösung	Natriumazid- Lösung (wurde mitgemischt) + Mischen						
Überführen in Küvette							
	Extinktion bestimmen (534 nm)						

Für jeden Wert erfolgte eine Doppelbestimmung.

Neben der enzymatischen Oxidation durch Ceruloplasmin kann PPD auch nicht- enzymatisch oxidiert werden. Das zugesetzte Natriumazid hemmt die enzymatische Oxidation (Curzon 1966). Durch die Zugabe des Natriumazids zu jeweils einem Reaktionsgefäß am Anfang bzw. am Ende der Reaktion ließ sich der Anteil der enzymatischen Reaktion bestimmen. Aus der Differenz der Extinktionen konnte anschließend die Ceruloplasminkonzentration bzw. -aktivität ermittelt werden. Die erste Zugabe des Natriumazids erfolgte nicht unmittelbar nach der Zugabe der PPD- Pufferlösung, um eine auftretende Verzögerung bei deren Oxidation zu berücksichtigen. Diese Verzögerungsperiode bei der Oxidation von PPD beruht wahrscheinlich auf einer reduzierenden Substanz, höchstwahrscheinlich Ascorbinsäure (Aprison & Grosz 1958; Wolf 1982).

Aus den gemessenen Extinktionen lässt sich die Ceruloplasminkonzentration wie folgt errechnen:

Cp (g/ l)= 0,752 (Extinktion R2- Extinktion R1) (Sunderman & Nomoto 1970).

## 3.4.3 Automatisierte Messung

Die automatisierte Messung mit dem Cobas Mira (Roche) unterschied sich von der manuellen Messung. Für die Berechnung der Ceruloplasminkonzentration wurde die Extinktionsänderung benötigt. Bei der automatischen Messung war zu deren Bestimmung nur eine Küvette notwendig, da die Extinktionsbestimmungen unmittelbar zu den vorgegebenen Zeitpunkten erfolgten und daraus die Extinktionsänderung bestimmt werden konnte. Die Temperatur der Reagenzküvette wurde automatisch konstant auf 37°C gehalten. Zunächst wurden hier 180 µl Natriumacetat- Pufferlösung in eine Küvette überführt. Danach wurden 20 µl Serum oder Plasma der Probe zugeführt und anschließend 90 µl der PPD- Pufferlösung. Das Mischen erfolgte ebenfalls automatisch, wie auch die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 550 nm. Nach fünf Minuten erfolgte die erste und 15,8 Minuten später (oder nach insgesamt 20,8 Minuten) die zweite Extinktionsmessung. Ausgegeben wurde dann deren Differenz. Durch die unmittelbare Extinktionsmessung konnte auf die Zugabe des giftigen Natriumazids verzichtet werden. Die Verzögerungsphase wurde dabei ebenfalls berücksichtigt.

Tabelle 12 zeigt den Ablauf der Messung mit dem Cobas Mira.

Tabelle 12: Ablauf der automatisierten Messung (Cobas Mira)

Freie Küvette steht bereit
▼
Automatische Zugabe von:
180 μl Natriumacetat- Pufferlösung
20 μl der Probe
90 μl der PPD- Pufferlösung
▼
Inkubation bei 37°C, lichtgeschützt – Verzögerungsphase 5 Minuten
▼
Erste Extinktionsmessung nach 5 Minuten (550 nm)
▼
Weitere Inkubation für 15,8 Minuten (37°C, lichtgeschützt)
▼
Zweite Extinktionsmessung 20,8 Minuten nach Start (550 nm)
▼
Ausgabe der Extinktionsdifferenz

# 3.4.4 Untersuchungen zur Methode

Nach Sunderman und Nomoto (1970) beeinträchtigt eine Verdünnung der Probe weniger als 31- fach die Ergebnisse, da das in der Probe enthaltene Chlorid einen hemmenden Effekt auf die Reaktion hat. Dieser Einfluss sollte hier mit Hilfe von Aqua dest. und unterschiedlich konzentrierter Kochsalzlösung untersucht werden. Dazu wurden jeweils zehn unveränderte Proben, zehn 1:1 (1Teil Probe/ 1Teil Aqua dest.) und 1:3 (1Teil Probe/ 3Teile Aqua dest.) mit Aqua dest. verdünnte Proben und zehn 1:1 (1Teil Probe/ 1Teil Kochsalzlösung) und 1:3 (1Teil Probe/ 3Teile Kochsalzlösung) mit Kochsalzlösung verdünnte Proben untersucht.

# 3.5 Zuverlässigkeit der Methode

#### 3.5.1 Kontrollproben

Bei Probemessungen zu Beginn der Versuche traten sofort verschiedene Auffälligkeiten wie beispielsweise erhebliche Schwankungen innerhalb der Doppelbestimmungen und Wiederholungsmessungen auf. Damit gewonnene Ergebnisse besser eingeordnet werden konnten, erfolgte ein Vergleich mit Kontrollproben. Zu deren Herstellung wurde jeweils eine Serum- und eine Plasmaprobe auf mehrere Einzelproben aufgeteilt und bei -20°C eingelagert. Aus diesem Vorrat wurden bei jeder Messung mindestens zwei Serum- und Plasmaproben mitbestimmt. Diese Werte wurden im Weiteren als Serum- bzw. Plasmakontrolle bezeichnet. Außerdem sollte aus den Kontrollproben ermittelt werden, ob über den Zeitverlauf ein Aktivitätsverlust zu beobachten ist.

#### 3.5.2 Korrekturfaktor

Grundsätzlich soll die automatische Methode alternativ zur manuellen Messung verwendet werden können. Da sich beide Methoden voneinander unterscheiden, war es nicht möglich, die jeweiligen Ergebnisse gleichzusetzen. Unter Berücksichtigung einiger Parameter konnte ein theoretischer Korrekturfaktor ermittelt werden. Dieser sollte zudem mit über die Kontrollund Betriebswerte errechneten Faktoren verglichen werden. Der Vergleich beider Methoden ist in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tabelle 13: Vergleich der manuellen und automatischen Methode

Manuell	Parameter	Automatisch
3150	Gesamtreaktionsmenge in μl	290
100	Probenmenge in μI	20
31,5	Verhältnis Gesamtreaktionsmenge/ Probenmenge	14,5
30	Reaktionszeit in min	15,8
1	Küvettendicke/ Messweg in cm	0,5
534	Wellenlänge der Messung in nm	550

Zur Berechnung des theoretischen Korrekturfaktors wurden die Verhältnisse der Chemikalien, der Reaktionszeiten und die Küvettenstärke bzw. die Schichtdicke, über welche die Extinktion gemessen wurde, berücksichtigt. Für die manuelle Messung betrug das Verhältnis der Probenmenge zur Gesamtmenge der Reaktionsstoffe 31,5 und 14,5 entsprechend für die automatische Messung. Das Verhältnis dieser Werte wiederum betrug 0,46. Aus der Reaktionszeit der automatischen zur manuellen Messung ergab sich ein Wert von 0,53. Daraus folgte ein Faktor von 0,87 (0,46/ 0,53= 0,87). Allerdings musste weiterhin berücksichtigt werden, dass die Küvetten der manuellen Messung doppelt so breit waren, wie die Küvetten des Cobas Mira. Somit resultierte schließlich ein theoretischer Korrekturfaktor von 1,74. Das heißt, die Werte der automatischen Messung multipliziert mit dem Faktor 1,74 entsprachen theoretisch denen der manuellen Messung. (Die Wellenlängen blieben dabei unbeachtet- siehe Punkt 5.5.2)

In der nachfolgenden Tabelle 14 sind Beziehungen zwischen einigen Parametern zusammengefasst.

Tabelle 14: Berechnung des theoretischen Faktors

Wert	Beziehung Parameter	Verhältnis					
А	Verhältnis Gesamtreaktionsmenge/ Probenmenge automatische	0,46					
	Messung (14,5) zu Verhältnis Gesamtreaktionsmenge/						
	Probenmenge manuelle Messung (31,5)						
В	Verhältnis Reaktionszeit_a/ Reaktionszeit_m	0,53					
	A/B	0,87					
С	Küvettenstärke_a 0,5 cm/ Küvettenstärke_m 1 cm	0,5					
	(A/B)/C= theoretischer Faktor	1,74					

## 3.5.3 Messgenauigkeit

Die Zuverlässigkeit der Messmethode wurde über verschiedene Verfahren überprüft. Zur Bestimmung der Präzision in der Serie erfolgte die Ermittlung eines intraday-Variationskoeffizienten über zehn Messungen. Die Präzision von Tag zu Tag wurde über den interday- Variationskoeffizienten bestimmt. Dazu wurden die Daten zunächst wie unter Punkt 3.8.1 beschrieben aufbereitet. Aus den verbliebenen Messergebnissen erfolgte die

Bestimmung des Variationskoeffizienten. Dies geschah sowohl für die manuelle als auch die automatische Messung.

# 3.6 Auswertung Betriebe

Bei der Auswertung der Proben der einzelnen Betriebe war von besonderem Interesse, ob es bezüglich der Laktationsgruppen Unterschiede in der Ceruloplasminaktivität gibt. Außerdem wurde verglichen, wie sich Serum und Plasma zueinander verhalten. Die Beziehungen zwischen manueller und automatischer Messung sollten ebenfalls betrachtet werden. Dazu wurden parallel mit der manuellen und automatischen Methode gemessene Betriebe betrachtet.

# 3.7 Einzelwerte/ Poolproben

Neben den Poolproben wurden von den Betrieben auch die Proben der einzelnen Rinder eingefroren. Eine Untersuchung bezog sich auf den Vergleich der Mittelwerte der Einzelproben mit den Ergebnissen der daraus gewonnenen Poolproben aus der automatischen Messung. Die verwendeten Einzelproben wurden ebenso wie die Poolproben über die parallel gemessenen Kontrollwerte ausgewählt.

#### 3.8 Statistik

#### 3.8.1 Datenaufbereitung

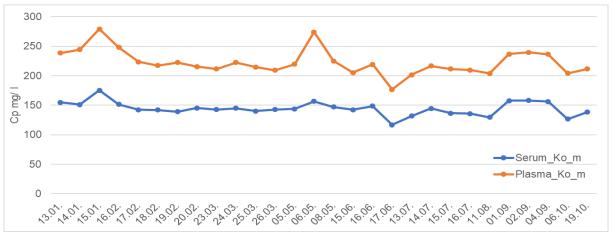
#### 3.8.1.1 Allgemeines

Wie unter Punkt 3.5.1 beschrieben, kam es immer wieder zu erheblichen Schwankungen innerhalb der Doppel- und/ oder Mehrfachbestimmungen. Deswegen wurden zu jeder Messung parallel Serum- und Plasmakontrollen mitbestimmt. Grundsätzlich wurde für diese Kontrollproben von einem fallenden oder über einen gewissen Zeitraum konstanten Verlauf ausgegangen (innerhalb der Messgenauigkeit). Größere Schwankung waren unter sonst gleichen Bedingungen bei wiederholten Messungen der gleichen Kontrollwertproben nicht zu

erwarten. Dennoch waren in der Datenmenge einige Werte enthalten, die deutlich vom Mittelwert abwichen. Da eine Erklärung für diese starken Ausreißer nicht gegeben werden konnte, wurden mögliche Ausreißer identifiziert bzw. definiert und entfernt (siehe unten).

### 3.8.1.2 Manuelle Messung

Aus allen erhobenen Kontrollwerten der manuellen Messung wurden zunächst diejenigen entfernt, bei denen mindestens ein Wert der Doppel- oder Mehrfachbestimmung mehr als 5 % vom Mittelwert des jeweiligen Messdurchlaufes abwich. Betraf dies nur einen Serum- oder Plasmakontrollwert, wurden dennoch sowohl die Werte der Serum- als auch die der Plasmakontrolle des jeweiligen Durchlaufes ausgeschlossen. Aus den verbliebenen Daten (aller Messdurchläufe) wurde die Standardabweichung ermittelt. Daraus ergab sich wiederum ein Bereich, der alle Werte bis zur doppelten Standardabweichung über und unter dem Mittelwert erfasste. Alle Werte außerhalb dieses Bereiches wurden als Ausreißer definiert und verworfen. Die verbliebenen Werte ließen sich, wie in Abbildung 1 gezeigt, darstellen.



Serum\_Ko\_m: Tagesmittelwerte der mit der manuellen Methode gemessenen Serumkontrollen

Plasma\_Ko\_m: Tagesmittelwerte der mit der manuellen Methode gemessenen Plasmakontrollen

Betrachtungszeitraum: 13.01. - 19.10.2015

Abbildung 1: Tagesmittelwerte der mit der manuellen Methode gemessenen Kontrollproben

Auch nach den oben beschriebenen Maßnahmen bleiben deutlich sichtbare Ausreißer (15.01., 06.05., 17.06.) enthalten. Diese wurden ebenfalls entfernt und die verbliebenen Daten für die weitere Auswertung verwendet.

### 3.8.1.3 Automatisierte Messung

Das Vorgehen bezüglich der automatischen Methode war ähnlich. Zunächst wurden ebenfalls Messwerte entfernt, die mehr als 5 % vom Mittelwert der jeweiligen Doppel- oder Mehrfachbestimmung abwichen. Bei der automatischen Methode waren in der Regel jedoch deutlich mehr Kontrollwerte pro Messdurchlauf vorhanden als bei der manuellen Methode. Wichen hier maximal zwei von mindestens acht Werten deutlich (>5 %) vom Mittelwert ab, wurden auch nur diese entfernt. Anschließend wurde ebenfalls der Bereich ermittelt, welcher alle Werte umfasste, die maximal in der Höhe der doppelten Standardabweichung vom Mittelwert entfernt lagen. Werte außerhalb dieses Bereiches wurden verworfen. (Abbildung mit den verbliebenen Werten siehe Punkt 4.1.1, Abbildung 3)

#### 3.8.1.4 Auswahl Bestände

Zur Auswertung gelangten nur Betriebe, die sowohl mit der manuellen als auch der automatischen Methode gemessen wurden. Um bei der Auswertung der Bestände auf möglichst korrekte und vergleichbare Werte zurückgreifen zu können, wurden bei jeder Bestandsmessung auch Serum- und Plasmakontrollen gemessen. Es wurden nur Bestände in die Auswertung einbezogen, deren parallel gemessene Kontrollen den Kriterien, wie unter den Punkten 3.8.1.2 und 3.8.1.3 beschrieben, genügten. Zusätzlich wurden bei jeder Bestandsmessung ebenfalls für alle Serum- und Plasmaproben der Laktationsgruppen Doppelbestimmungen durchgeführt. Wichen Werte dieser Doppelbestimmungen mehr als 5 % nach oben oder unten vom Mittelwert der Doppelbestimmung ab, wurden diese Durchläufe aus der Betrachtung ausgeschlossen.

#### 3.8.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der Computerprogramme Microsoft Excel (2016) und IBM SPSS Statstics (Version 24.0.0.0).

Die Genauigkeit der Messmethode wurde sowohl für die manuelle als auch die automatische Messung über den Variationskoeffizienten angegeben.

## Lagerungsversuch

Der Vergleich der Daten der verschiedenen Messtage des Lagerungsversuches erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse (Allgemeines lineares Modell) mit Messwertwiederholung. Das Vorliegen einer Normalverteilung wurde mit dem Shapiro- Wilk- Test überprüft. Zudem wurde die Voraussetzung der Sphärizität untersucht. Wurde der Mauchly- Test signifikant (p< 0,05), erfolgte eine Greenhouse- Geisser- Korrektur der Freiheitsgrade. Es sollte untersucht werden, ob sich die Ceruloplasminkonzentrationen der Messtage über die Dauer des Lagerungsversuches signifikant unterscheiden. Das Testverfahren nutzte eine F- Statistik, der eine F- Verteilung zugrunde lag. Das Ergebnis wurde in der Form: F(Freiheitsgrad Zähler, Freiheitsgrad Nenner)= F- Wert, p = Signifikanz ausgegeben. Das partielle  $\eta^2$  gab die Effektstärke an (0-1). Wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Gruppen festgestellt, erfolgte mit Hilfe der Bonferroni- Korrektur die weitere Untersuchung, zwischen welchen der Gruppen Unterschiede bestanden. Dabei kennzeichneten verschiedene Buchstaben signifikante Unterschiede auf dem Niveau p<0,05, d. h. mit demselben Buchstaben gekennzeichnete Ergebnisse unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander.

Zudem wurde geprüft, ob sich die Lagerungsbedingungen (Raumtemperatur, Kühlschrank, Einfrieren/ Auftauen) voneinander unterscheiden. Die Analyse erfolgte über die Betrachtung der Zwischensubjekteffekte.

#### **Betriebe**

In den Betrieben wurden Rinder verschiedener Laktationsgruppen beprobt. Um zu prüfen, ob statistisch signifikante Unterschiede in den Ceruloplasminkonzentrationen dieser Gruppen bestehen, wurde eine Einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Dafür wurden die Daten zunächst mit Hilfe des Shapiro- Wilk- Tests auf Normalverteilung geprüft. Zudem wurde die Varianzhomogenität mit dem Levene- Test untersucht. Welche Laktationsgruppen sich voneinander unterscheiden, zeigte ein Post- Hoc- Test (Bonferroni). Dabei kennzeichneten verschiedene Buchstaben signifikante Unterschiede auf dem Niveau p<0,05, d. h. mit

demselben Buchstaben gekennzeichnete Ergebnisse unterschieden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Zur Auswertung gelangten nur Proben, die sowohl mit der manuellen als auch der automatischen Methode gemessen wurden. Die Univariate Varianzanalyse diente dem Vergleich der Serum- und Plasmaproben. Zudem sollte die manuelle in der Weise mit der automatischen Methode verglichen werden, dass ein Faktor bestimmt und mit dem errechneten Faktor vergleichen werden kann.

Nach der Ermittlung dieser Daten, wurde die manuelle der automatischen Methode in einem Methodenvergleich gegenübergestellt. Dies geschah neben der Darstellung des Pearson-Korrelationskoeffizienten über die Verwendung der Bland- Altman- Analyse. Mit Hilfe des t-Tests wurde überprüft, ob sich die gebildeten Differenzen (automatische minus manuelle Methode) signifikant von null unterscheiden. Anschließend erfolgte per Regressionsanalyse die Untersuchung auf einen möglichen Trend.

Für sämtliche Untersuchungen wurden Unterschiede auf dem Niveau p< 0,05 als signifikant angesehen.

#### 3.8.3 Einheiten

Sofern nicht anders definiert, wurden die Ceruloplasminkonzentrationen in mg/ I angegeben.

Cp (mg/ l)= 752\* (Extinktion R2- Extinktion R1)

Für Hinweise zu den Begriffen Aktivität bzw. Konzentration siehe Punkt 2.2.10.

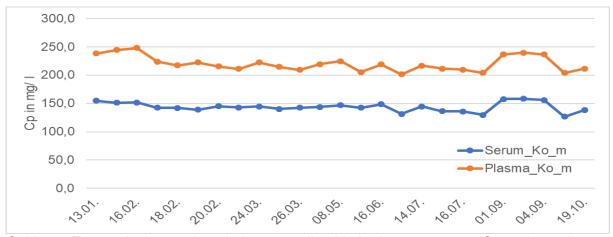
# 4 Ergebnisse

# 4.1 Zuverlässigkeit der Methode

# 4.1.1 Kontrollproben

### **Manuelle Messung**

Nach der Entfernung von Ausreißern fanden die in Abbildung 2 dargestellten Kontrollwerte für die weitere Analyse Verwendung. Zu Gunsten einer übersichtlichen Darstellung wurde auf eine maßstabsgetreue Darstellung der Werte auf der Zeitachse verzichtet.



S\_Ko\_m: Tagesmittelwerte der mit der manuellen Methode gemessenen Serumkontrollen: y=-0.2499x+147.0;  $R^2=0.0488$ 

 $P_Ko_m$ : Tagesmittelwerte der mit der manuellen Methode gemessenen Plasmakontrollen: y=-0.6185x+228.4;  $R^2=0.116$ 

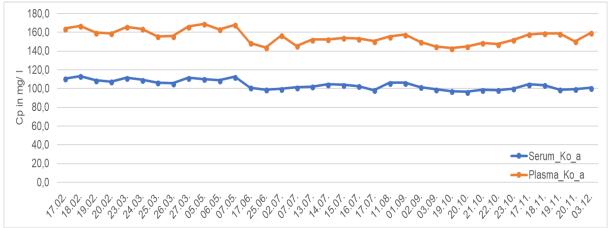
Betrachtungszeitraum: 13.01.-.19.10.2015

# Abbildung 2: Verbliebene Kontrollwerte aus der manuellen Messung

Die Trendanalyse der Daten aus Abbildung 2 ergab für die Serumkontrollen die Gleichung y= -0,2499x + 147,0. Die Ceruloplasminkonzentration war demnach über den Zeitverlauf fallend. Auch der Verlauf der Plasmakonzentration wies nach der Gleichung y= -0,6185x + 228,4 einen fallenden Verlauf auf.

# **Automatische Messung**

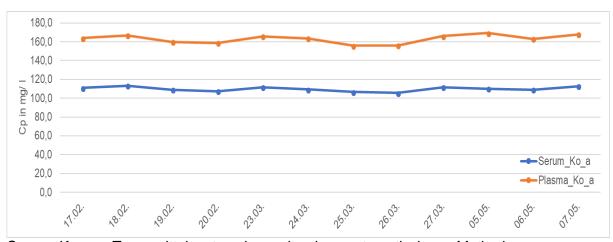
Die Daten der automatischen Messung wurden ebenfalls, wie unter Punkt 3.8.1.3 beschrieben, aufbereitet. Abbildung 3 zeigt den Verlauf der verbliebenen Werte. Zu Gunsten einer übersichtlichen Darstellung wurde auf eine maßstabsgetreue Darstellung der Werte auf der Zeitachse verzichtet.



Serum\_Ko\_a: Tagesmittelwerte der mit der automatischen Methode gemessenen Serumkontrollen: y=-0,3561x+110,5;  $R^2=0,5486$  Plasma\_Ko\_a: Tagesmittelwerte der mit der automatischen Methode gemessenen Plasmakontrollen: y=-0,3668x+162,2;  $R^2=0,2586$  Betrachtungszeitraum: 17.02.-03.12.2015

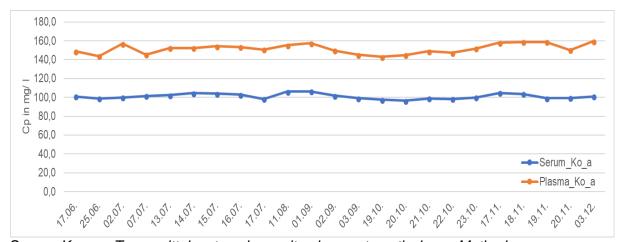
## Abbildung 3: Verbliebene Kontrollwerte aus der automatischen Messung

Die Trendgeraden sowohl der Serum- (y= -0,3561x + 110,5) als auch der Plasmakontrollen (y= -0,3668x + 162,2) wiesen über den Zeitraum vom 17.02.-03.12.2015 einen fallenden Verlauf auf. Bei der Betrachtung von Abbildung 3 entstand jedoch der Eindruck, dass die Kontrollwerte zunächst in einem gewissen Rahmen konstant verlaufen, um dann vom 07.05. auf den 17.06. abzufallen und anschließend wieder bis zum 03.12. konstant bleiben. Eine Trennung des obigen Verlaufs auf die Zeiträume vom 17.02. bis zum 07.05. und dem 17.06. bis zum 03.12. bestätigte diesen Eindruck und ist in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt.



Serum\_Ko\_a: Tagesmittelwerte der mit der automatischen Methode gemessenen Serumkontrollen: y=-0.0397x+110.1;  $R^2=0.0035$  Plasma\_Ko\_a: Tagesmittelwerte der mit der automatischen Methode gemessenen Plasmakontrollen: y=0.2689x+161.4;  $R^2=0.0457$ 

Abbildung 4: Verlauf der automatischen Kontrollen vom 17.02.-07.05.2015



Serum\_Ko\_a: Tagesmittelwerte der mit der automatischen Methode gemessenen Serumkontrollen: y=-0,0696x+102,0;  $R^2=0,0288$  Plasma\_Ko\_a: Tagesmittelwerte der mit der automatischen Methode gemessenen Plasmakontrollen: y=0,2335x+148,9;  $R^2=0,0932$ 

Abbildung 5: Verlauf der automatischen Kontrollen vom 17.06.-03.12.2015

Für die in den Abbildungen 4 und 5 gezeigten Kontrollen ließen sich ebenfalls Trendgeraden ermitteln. Tabelle 15 zeigt eine Zusammenfassung dieser Gleichungen.

Tabelle 15: Gleichungen zum Verlauf der Kontrollen der automatischen Messung, nach Zeitraum

Zeitraum	Serumkontrollen	Plasmakontrollen
17.0203.12.2015	y= -0,3561x + 110,5	y= -0,3668x + 162,2
17.0207.05.2015	y= -0,0397x + 110,1	y= 0,2689x + 161,4
17.0603.12.2015	y= -0,0696x + 102,0	y= 0,2335x + 148,9

Demnach führte eine Teilung des Gesamtzeitraumes auf die genannten Zeiträume zu einer deutlichen Veränderung der Steigungen. Diese waren für die Serumproben in den jeweiligen Zeiträumen nun minimal fallend. Bei den Plasmaproben führte die Aufteilung der Zeiträume von einer fallenden Steigung zu leicht ansteigenden Werten.

# 4.1.2 Messgenauigkeit

#### Präzision in der Serie

Zur Bestimmung der Messgenauigkeit innerhalb eines Durchlaufes wurde eine Zehnfachbestimmung durchgeführt. Die Zehnfachbestimmungen ergaben in der manuellen Messung für die Serumproben Variationskoeffizienten von 0,012 und 0,015. Die Genauigkeit der Wiederholbarkeit der Plasmaproben lag zwischen 0,020 und 0,032. Die Ergebnisse sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tabelle 16: Präzision in der Serie aus der manuellen Messung (n= 10, MW± SD in mg/ I)

Probe	MW	SD	VK in %	Probe	MW	SD	VK in %
Serum 1	190	2,4	1,24	Plasma 1	237	4,7	2,00
Serum 2	220	3,3	1,50	Plasma 2	225	7,1	3,15

VK: intraday- Variationskoeffizient

Die Zehnfachbestimmungen ergaben in der automatischen Messung für die Serumproben Variationskoeffizienten von 0,010 und 0,024. Die Genauigkeit der Wiederholbarkeit der Plasmaproben lag bei 0,011. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17: Präzision in der Serie aus der automatischen Messung (n= 10, MW $\pm$  SD in mg/ I)

Probe	MW	SD	VK in %	Probe	MW	SD	VK in %
Serum 1	74	1,8	2,37	Plasma 1	97	1,0	1,06
Serum 2	73	0,7	1,00	Plasma 2	97	1,0	1,07

VK: intraday- Variationskoeffizient

# Präzision von Tag zu Tag

Die Genauigkeit von Tag zu Tag wurde über die Serum- und Plasmakontrollen ermittelt. Dazu wurden die Daten zunächst, wie unter den Punkten 3.8.1.2 und 3.8.1.3 beschrieben, aufbereitet. Aus den verbliebenen Werten wurden diejenigen ausgewählt, bei denen die Serum- und Plasmakontrollen an einem Tag parallel manuell und automatisch gemessen wurden. Die Mittelwerte der Kontrollen der einzelnen Messtage bildeten die Grundlage für die Berechnung des Variationskoeffizienten.

Wie unter Punkt 4.1.1 beschrieben, fielen die Werte der automatischen Kontrollen am 17.06. plötzlich ab. Wurden die Variationskoeffizienten für den gesamten Zeitraum angegeben, unterschieden sie sich von denen, die bei der Teilung des Zeitraumes auf den 17.02.-05.05. und 13.07.-19.10. errechnet wurden. Dies galt sowohl für die Serum- als auch für die Plasmakontrollen. Die Variationskoeffizienten der manuellen Messung waren für den letzten Zeitraum am größten. Dies lagt an den deutlich höheren Werten zum Ende dieses Zeitfensters. Der Zeitraum vom 17.02.-05.05. bei den Serumkontrollen, ergab den kleinsten Koeffizienten aller Werte. Bezüglich der automatischen Messung galt, dass sich die Variationskoeffizienten bei einer separaten Betrachtung der Zeiträume deutlich verbesserten. In Tabelle 18 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 18: Präzision von Tag zu Tag (MW± SD in mg/ I) (17.02.-19.10.2015)

Probe	MW	SD	VK in %	n						
Manuelle Methode										
Serumkontrolle_m 17.02-19.10.	142	7,5	5,26	17						
Serumkontrolle_m 17.02-05.05.	143	2,0	1,41	9						
Serumkontrolle_m 13.07-19.10.	142	11,1	7,82	8						
Plasmakontrolle_m 17.02-19.10.	217	10,1	4,66	17						
Plasmakontrolle_m 17.02-05.05.	217	5,1	2,35	9						
Plasmakontrolle_m 13.07-19.10.	216	14,3	6,59	8						
Auto	matische Me	ethode								
Serumkontrolle_a 17.02-19.10.	107	4,1	3,84	17						
Serumkontrolle_a 17.02-05.05.	109	2,5	2,27	9						
Serumkontrolle_a 13.07-19.10.	103	2,8	2,75	8						
Plasmakontrolle_a 17.02-19.10.	158	6,8	4,31	17						
Plasmakontrolle_a 17.02-05.05.	162	4,8	2,97	9						
Plasmakontrolle_a 13.07-19.10.	152	4,4	2,87	8						

VK: interday- Variationskoeffizient

Aus dem oben genannten Vorgehen resultierten Variationskoeffizienten, die aus vorsortierten Werten entstanden sind. Die Messgenauigkeit könnte somit überschätzt worden sein. Daher wurde dieser Versuch nach der Etablierung der Methode für die automatische Messung wiederholt. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich über 13 Monate. Tabelle 19 zeigt die entsprechenden Variationskoeffizienten.

Tabelle 19: Präzision von Tag zu Tag nach Etablierung der Methode, automatische Messung, (n= 10, MW± SD in mg/ l)

Probe	MW	SD	VK in %	Probe	MW	SD	VK in %
Serum 1	90	7,7	8,57	Plasma 1	114	9,4	8,18
Serum 2	89	7,7	8,73	Plasma 2	116	9,9	8,50

VK: interday- Variationskoeffizient

Mit Werten von 8,18 bis 8,73 lagen die Variationskoeffizienten tatsächlich über den zuvor ermittelten Koeffizienten. Die Ergebnisse in Serum und Plasma unterschieden sich demnach nur geringfügig.

# 4.1.3 Untersuchungen zur Methode

# Verdünnung

Eine Verdünnung der Probe 1:1 (1Teil Probe/ 1Teil Medium) oder 1:3 (1Teil Probe/ 3Teile Medium) mit Aqua dest. bzw. physiologischer Kochsalzlösung führte zu den in den Tabellen 20 und 21 dargestellten Ergebnissen. Ein mögliches zu erwartendes Ergebnis war eine Konzentration in Höhe von 1/ Verdünnungsfaktor\* unverdünnter Konzentration. Dementgegen lagen die ermittelten Werte jedoch deutlich darüber.

Wurde die Probe vollständig durch Aqua dest. ersetzt, konnte eine Aktivität von ca. 19 mg/ I ermittelt werden. Da ein enzymatischer Umsatz mangels Ceruloplasmin nicht ablaufen konnte, entsprach diese dem nicht- enzymatischen Umsatz der PPD- Lösung und konnte die dargestellten Ergebnisse erklären.

Tabelle 20: Vergleich der unverdünnten Probe mit der 1:1 bzw. 1:3 mit Aqua dest. verdünnten Probe (n=10; in mg/ l)

Proben Nr.	unverdünnt	1:1 Aqua	1:1 Aqua	1:3 Aqua	1:3 Aqua
		dest.	dest./	dest.	dest./
			unverdünnt		unverdünnt
1	117	69	0,59	38	0,33
2	128	73	0,57	43	0,33
3	131	72	0,55	41	0,32
4	110	61	0,56	36	0,32
5	124	74	0,60	40	0,32
6	129	73	0,57	41	0,32
7	114	62	0,55	35	0,31
8	123	65	0,53	43	0,35
9	125	73	0,59	43	0,34
10	184	102	0,55	58	0,32
	,		'		•
MW	128,3	72,5	0,565	41,8	0,326
SD	20,75	11,24	0,0213	6,46	0,0132

Tabelle 21: Vergleich der unverdünnten Probe mit der 1:1 bzw. 1:3 mit NaCl verdünnten Probe (n=10; in mg/l)

Proben Nr.	unverdünnt	1:1 NaCl	1:1 NaCl/	1:3 NaCl	1:3 NaCl/
			unverdünnt		unverdünnt
1	117	62	0,53	32	0,28
2	128	65	0,51	34	0,27
3	131	64	0,49	35	0,27
4	110	56	0,51	31	0,28
5	124	65	0,53	35	0,28
6	129	65	0,51	36	0,28
7	114	56	0,49	31	0,27
8	123	61	0,50	33	0,27
9	125	65	0,52	35	0,28
10	184	94	0,51	47	0,25
			'		•
MW	128,3	65,4	0,509	34,7	0,271
SD	20,75	10,58	0,0150	4,55	0,0085

Tabelle 22 zeigt eine Gegenüberstellung zwischen den Verdünnungen mit Auqa dest. und physiologischer Kochsalzlösung.

Bemerkenswert war, dass die mit NaCl- Lösung verdünnten Proben zu niedrigeren Konzentrationen als die mit Aqua dest. verdünnten Proben führten.

In Tabelle 23 sind die entsprechenden Regressionsgleichungen zu den durchgeführten Untersuchungen angegeben.

Tabelle 22: Gegenüberstellung der Verdünnungen mit Aqua dest. und NaCl- Lösung (n=10)

Proben Nr.	1:1 Aqua dest./ 1:1 NaCl	1:3 Aqua dest./ 1:3 NaCl
1	1,10	1,19
2	1,12	1,26
3	1,12	1,18
4	1,09	1,17
5	1,13	1,15
6	1,12	1,15
7	1,12	1,14
8	1,07	1,32
9	1,13	1,23
10	1,08	1,25
		,
MW	1,110	1,204
SD	0,0217	0,0590

Tabelle 23: Regressionsgleichungen zu den Verdünnungspaaren (n= 10)

Verdünnung	Regressionsgleichung	R <sup>2</sup>
Unverdünnt/ 1Aqua dest.	y= 0,5274x + 4,7991	0,9476
Unverdünnt/ 1NaCl	y= 0,5026x + 0,8617	0,9708
Unverdünnt/ 3Auqua dest.	y= 0,3016x + 3,1286	0,9387
Unverdünnt/ 3NaCl	y= 0,2166x + 6,9088	0,9756
3Aqua dest./ 1Aqua dest.	y= 0,5417x + 2,5693	0,8889
3NaCl/ 1NaCl	y= 0,4251x + 6,9176	0,9780
1NaCl/ 1Aqua dest.	y= 0,9347x - 2,3899	0,9856
3NaCl/ 3Aqua dest.	y= 0,6736x + 6,5229	0,9145

In den Abbildungen 6 und 7 sind exemplarisch die Regressionsgleichungen für die Verdünnungen der unveränderten Proben 1:1 mit Aqua dest. und NaCl- Lösung dargestellt.

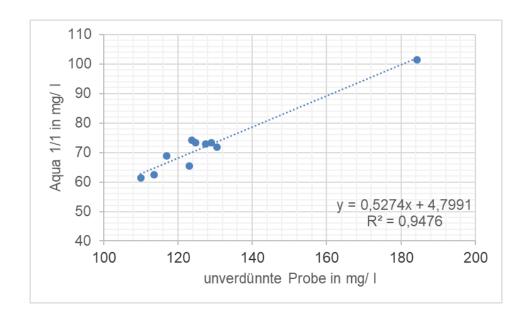


Abbildung 6: Regressionsgerade der Werte der unverdünnten und der zur Hälfte mit Aqua dest. verdünnten Proben

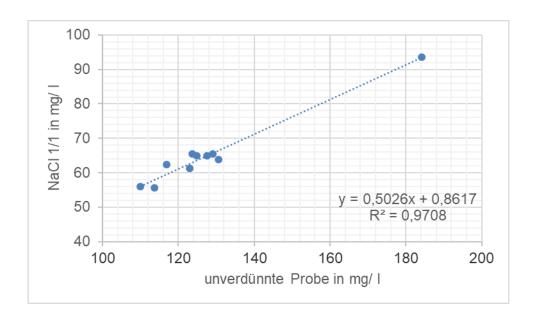


Abbildung 7: Regressionsgerade der Werte der unverdünnten und der zur Hälfte mit NaCl- Lösung verdünnten Proben

#### **Effekt von Chlorid**

Der Vergleich der Verdünnungen mit Aqua dest. und physiologischer Kochsalzlösung zeigte für die mit NaCl- Lösung verdünnten Proben niedrigere Konzentrationen als für die mit Aqua dest. verdünnten Proben. In Tabelle 24 sind Ergebnisse von 1:1 mit Aqua dest. und mit NaCl-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen verdünnter Proben angegeben. Mit zunehmender Chloridkonzentration sankt die Ceruloplasminaktivität.

Tabelle 24: Gegenüberstellung von 1:1 mit Aqua dest. und NaCl- Lösung unterschiedlicher Konzentration verdünnter Proben (n= 6; in mg/l)

Probe	A.dest.	0,9 % NaCl	1,8 % NaCl	2,7 % NaCl	3,6 % NaCl
1	42	38	34	32	29
2	53	50	48	47	45
3	93	86	79	74	68
4	54	50	44	42	37
5	68	62	58	52	47
6	68	62	56	51	49

In Tabelle 25 sind die entsprechenden Regressionsgleichungen der Verdünnungen 1:1 mit Aqua dest. verglichen mit unterschiedlich konzentrierten NaCl- Lösungen angegeben.

Tabelle 25: Regressionsgleichungen zu den Verdünnungsreihen aus Tabelle 24

Aqua dest./	Regressionsgleichung	R <sup>2</sup>
0,9 % NaCl	y= 0,898x + 1,1694	0,9982
1,8 % NaCl	y= 0,8202x + 1,7735	0,9925
2,7 % NaCl	y= 0,7456x + 2,5722	0,9778
3,6 % NaCl	y= 0,6714x + 3,5616	0,9687

Wie in Abbildung 8 ersichtlich, fiel die Ceruloplasminkonzentration linear mit zunehmender Chloridkonzentration.

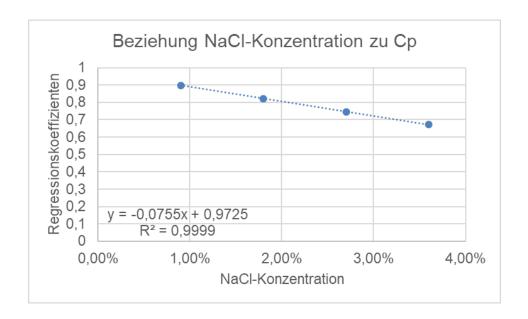


Abbildung 8: Abhängigkeit der Regressionskoeffizienten aus Tabelle 25 von den Konzentrationen der zur Verdünnung verwendeten NaCl- Lösung

# 4.2 Lagerungsversuch

# 4.2.1 Allgemeines

Der Tag der Probensammlung wurde als Messtag 0 bezeichnet. Die darauffolgenden Messungen erfolgten an den Messtagen 1 bis 7. Am zwölften und vierzehnten Tag nach der Probensammlung erfolgten weitere Messungen, diese wurden mit Messtag 12 und 14 bezeichnet.

# 4.2.2 Lagerung der Proben bei Raumtemperatur (bei 20°C)

Die deskriptive Statistik lieferte die in der Tabelle 26 zusammengestellten Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und die Minimum- und Maximumwerte an den Messtagen jeweils für die Serum- und Plasmawerte.

Tabelle 26: Cp- Messwerte aus der Lagerung bei Raumtemperatur (n= 10, in mg/ I)

MT	MW± SD	M	Min	Max	MW± SD	М	Min	Max
	Ser	Plas	sma					
MT0	146± 27,4 <sup>a</sup>	149	106	198	174± 31,6 <sup>a</sup>	182	122	226
MT1	141± 28,0 <sup>b</sup>	146	102	193	173± 31,5 <sup>a,b</sup>	180	124	226
MT2	144± 27,9 <sup>a,c</sup>	148	102	194	175± 30,8 <sup>a,b,c</sup>	181	125	227
MT3	143± 28,3a,c,d	149	101	195	175± 30,9 <sup>a,b,c,d</sup>	183	125	224
MT4	143± 27,4 <sup>a,b,c,d,e</sup>	149	102	194	175± 30,8 <sup>a,b,c,d,e</sup>	182	126	225
MT5	142± 27,6 <sup>b,c,d,e,f</sup>	148	100	192	172± 29,1a,b,c,d,e,f	177	124	218
MT6	142± 27,5 <sup>b,c,d,e,f,g</sup>	148	102	191	173± 30,0a,b,c,d,e,f,g	180	123	221
MT7	142± 27,4 <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>	149	99	190	173± 30,1 <sup>a,b,c,d,e,f,g</sup>	176	125	222
MT12	132± 24,5 <sup>i</sup>	138	91	170	167± 28,4 <sup>a,b,i</sup>	171	120	212
MT14	131± 24,9 <sup>i</sup>	139	91	173	162± 25,9 <sup>a,b,i</sup>	162	115	206

a,b,c,d,e,f,g,h,i verschiedene Indizes weisen auf Unterschiede auf dem Niveau p< 0,05 hin

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse- Geisser- Korrektur zeigte für die Serumproben, dass es statistisch signifikante Unterschiede zwischen Messzeitpunkten gab,  $F(2,4;\ 22,0)=\ 43,8,\ p<\ 0,001,\ partielles\ \eta^2=\ 0,83.$  Demnach ließen sich 83 % der Varianzunterschiede zwischen den Gruppen über den Messtag, also die Lagerungsdauer erklären. Auch bei den Plasmaproben unterschieden sich die Werte einiger Messzeitpunkte signifikant voneinander,  $F(1,8;\ 15,8)=21,8,\ p<\ 0,001,\ partielles\ \eta^2=\ 0,71.$  Jedoch konnte hier nur ein etwas geringerer Anteil von 71 % der Varianzunterschiede auf die Lagerungsdauer zurückgeführt werden.

Paarweise Vergleiche der Serumproben unter Verwendung der Bonferroni- Korrektur ergaben, dass die am Tag der Probensammlung ermittelten Ceruloplasminwerte signifikant größer waren als die der Messtage 1, 5, 6 sowie 12 und 14. Sie lagen außerdem über denen der restlichen Gruppen, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Zusätzlich gab es signifikante Unterschiede zwischen Messtag 1 und 2, 3, 12 und 14. Die Werte der Messtage 2 bis 7 unterschieden sich nicht signifikant. Sämtliche Ceruloplasminaktivitäten vom Tag der Probennahme bis zum siebten Messtag waren signifikant höher als die der Messtage 12 und 14. Messtag 12 und 14 unterschieden sich nicht signifikant.

Die Auswertung der Plasmaproben unter Verwendung einer Bonferroni- Korrektur ergab, dass sich die Ceruloplasminkonzentrationen vom Tag der Probennahme und dem ersten Messtag nicht signifikant von denen der anderen Messtage unterschieden. Messtag 2 bis Messtag 7 unterschieden sich ebenfalls nicht statistisch signifikant voneinander, jedoch waren die

Konzentrationen dieser Zeitpunkte signifikant höher als die der Messtage 12 und 14. Letztere unterschieden sich wiederum nicht signifikant voneinander.

Der zeitliche Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der bei Raumtemperatur gelagerten Serum- und Plasmaproben ist den Abbildungen 9 und 10 dargestellt.

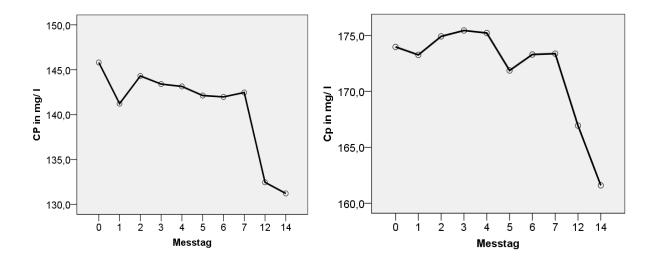


Abbildung 9: Verlauf der Serumwerte bei Lagerung bei Raumtemperatur

Abbildung 10: Verlauf der Plasmawerte bei Lagerung bei Raumtemperatur

Der Vergleich der Probentypen miteinander ergab auch hier ein signifikantes Ergebnis F(1; 18)= 6,0, (p<0,025, partielles  $\eta^2$ = 0,25). In Abbildung 11 ist ersichtlich, dass die Plasmaproben zu jedem Zeitpunkt über den jeweiligen Serumproben lagen. Dabei konnten 25 % der Varianzunterschiede der Gruppen über den Probentyp erklärt werden.

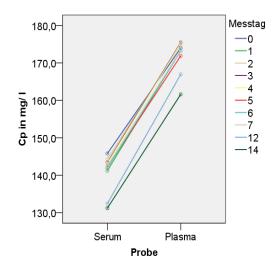


Abbildung 11: Vergleich der Serum- und Plasmawerte der bei Raumtemperatur gelagerten Proben

# 4.2.3 Lagerung der Proben im Kühlschrank (bei 8°C)

Die deskriptive Statistik lieferte die in der Tabelle 27 zusammengestellten Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und die Minimum- und Maximumwerte an den Messtagen jeweils für die Serum- und Plasmawerte.

Tabelle 27: Cp- Messwerte aus der Lagerung im Kühlschrank (n= 10, in mg/ l)

MT	MW± SD	M	Min	Max	MW± SD	M	Min	Max
	Serum				Plasma			
MT0	146± 27,4 <sup>a</sup>	149	106	198	174± 31,6 <sup>a</sup>	182	122	226
MT1	144± 27,4 <sup>a,b</sup>	146	104	196	175± 32,1 <sup>a,b</sup>	182	123	226
MT2	148± 27,7 <sup>a,b,c</sup>	154	105	198	178± 32,9 <sup>a,b,c</sup>	182	124	231
MT3	147± 29,1a,b,c,d	152	105	201	178± 31,5 <sup>a,c,d</sup>	182	127	228
MT4	145± 27,3a,b,c,d,e	151	104	196	177± 32,1 <sup>a,b,c,d,e</sup>	183	127	231
MT5	144± 26,8a,b,d,e,f	150	103	193	175± 31,3a,b,c,d,e,f	179	123	227
MT6	144± 28,4a,b,e,f,g	149	102	196	177± 31,7 <sup>b,c,d,e,f,g</sup>	183	125	229
MT7	146± 28,6a,b,c,d,e,f,g	151	102	197	177± 31,3 <sup>a,b,c,d,e,f,g,h</sup>	180	128	230
MT12	138± 27,0 <sup>i</sup>	145	97	186	169± 27,9 <sup>a,b,f,i</sup>	173	127	215
MT14	136±24,0 <sup>a,b,f,g,i</sup>	143	97	170	170± 28,7 <sup>a,b,f,i</sup>	174	124	217

a,b,c,d,e,f,g,h,i verschiedene Indizes weisen auf Unterschiede auf dem Niveau p< 0,05 hin

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse- Geisser- Korrektur zeigte für die Serumproben, dass es statistisch signifikante Unterschiede zwischen Messzeitpunkten gab,  $F(2,3;\ 21,0)=\ 21,7,\ p<\ 0,001,\ partielles\ \eta^2=\ 0,71.$  Demnach ließen sich 71 % der Varianzunterschiede zwischen den Gruppen über den Messtag, also die Lagerungsdauer erklären. Auch bei den Plasmaproben unterschieden sich die Werte einiger Messzeitpunkte signifikant voneinander,  $F(2,4;\ 21,9)=\ 17,4,\ p<\ 0,001,\ partielles\ \eta^2=\ 0,66.$  Jedoch konnte hier nur ein etwas geringerer Anteil von 66 % der Varianzunterschiede auf die Lagerungsdauer zurückgeführt werden.

Paarweise Vergleiche der Serumproben unter Verwendung der Bonferroni- Korrektur ergaben keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Ceruloplasminkonzentrationen der Serumproben am Tag der Probensammlung und denen der Messtage 1-7. Signifikant höher war die Ceruloplasminkonzentration gegenüber der Konzentration an Messtag 12, sie war außerdem deutlich höher als jene von Messtag 14. Der Unterschied zu Messtag 14 war jedoch

nicht signifikant. Die Messtage 1, 2, 3 und 4 unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Signifikant höher als die Ceruloplasminkonzentrationen an den Messtagen 5 und 6 war die Konzentration des zweiten Messtages. Auch jene des dritten Messtages überstieg die des sechsten Tages signifikant. Die Ceruloplasminkonzentration an Messtag 12 war signifikant geringer als alle vorherigen und unterschied sich nicht signifikant von der des letzten Messtages. Auch die Konzentration an Messtag 14 war niedriger als die vorangegangenen Ceruloplasminkonzentrationen. Signifikant war dieser Unterschied jedoch nur für die Messtage 2, 3, 4 und 7.

Die Auswertung der Plasmaproben ergab bei Verwendung einer Bonferroni- Korrektur, dass sich die Ceruloplasminkonzentrationen vom Tag der Probennahme nicht signifikant von denen der anderen Messtage, ausgenommen Messtag 6, unterschieden. Verglich man Messtag 1 und 3, so waren die Konzentrationen des dritten Messtages signifikant höher. Zwischen den Messtagen 2, 3, 4, 5, 6 und 7 gab es keine signifikanten Unterschiede. Die Ceruloplasminkonzentration des zwölften Messtages war niedriger als die der vorangegangenen Messtage und des Messtages 14. Für die Messtage 2, 3, 4, 6 und 7 war dieser Unterschied signifikant. Signifikant geringer als die Werte von Messtag 14 waren die Konzentrationen der Messtage 2, 3, 4, 6 und 7.

Der zeitliche Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der bei Kühlschranktemperatur gelagerten Serum- und Plasmaproben ist den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

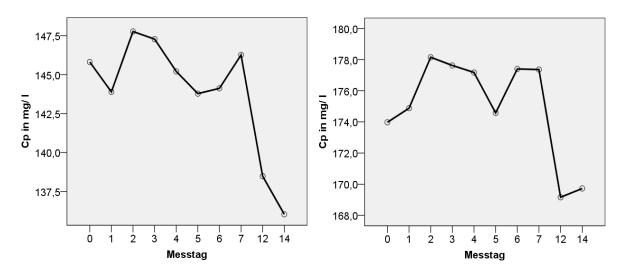


Abbildung 12: Verlauf der Serumwerte bei Lagerung im Kühlschrank

Abbildung 13: Verlauf der Plasmawerte bei Lagerung im Kühlschrank

Der Vergleich der Probentypen miteinander ergab auch hier ein signifikantes Ergebnis F(1; 18)= 5,7, p< 0,028, partielles  $\eta^2$ = 0,24. In Abbildung 14 ist ersichtlich, dass die Konzentrationen der Plasmaproben zu jedem Zeitpunkt über denen der jeweiligen Serumproben lagen. Dabei konnten 24 % der Varianzunterschiede der Gruppen über den Probentyp erklärt werden.

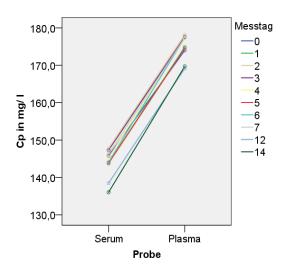


Abbildung 14: Vergleich der Serum- und Plasmawerte der im Kühlschrank gelagerten Proben

# 4.2.4 Lagerung der Proben im Tiefkühler (bei -20°C)

Für diese Untersuchung wurden die ermittelten Kontrollwerte (siehe Punkt 3.5.1) eines Messtages zu einem Tagesmittelwert zusammengefasst. Dabei erfolgte die Betrachtung der Serum- und Plasmakontrollen separat. Eine Regressionsanalyse ermöglichte die Bewertung der Konzentrationsveränderungen im Zeitverlauf.

#### **Manuelle Messung**

In Abbildung 15 ist der Verlauf der Tagesmittelwerte der mit der manuellen Methode bestimmten Serumkontrollen dargestellt. Die Regressionsanalyse lieferte die Gleichung y= -0.0429x + 1951.2. Demnach fiel die Ceruloplasminkonzentration der Serumproben in 30 Tagen um ca. 1.3 mg /l ab. Abbildung 16 zeigt die Tagesmittelwerte der manuellen Plasmakontrollen. Die Regressionsanalyse lieferte die Gleichung y= -0.089x + 3971.3. Dies

bedeutete eine Verringerung der Ceruloplasminkonzentration der Plasmaproben um ca. 2,7 mg /l in 30 Tagen.

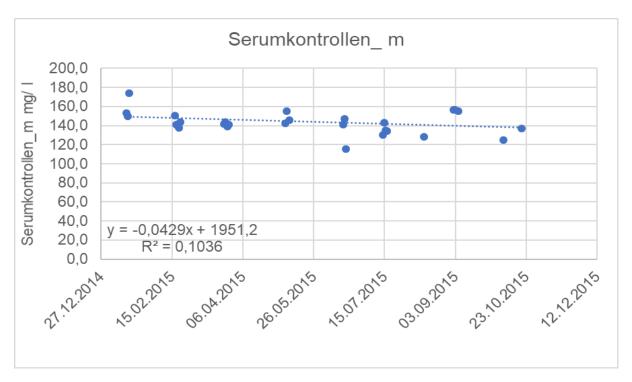


Abbildung 15: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Serumkontrollproben (Lagerung bei -20°C)

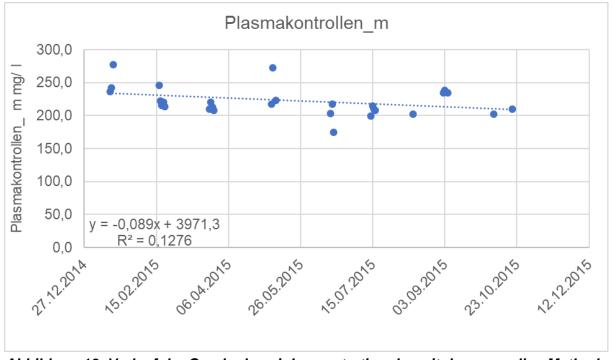


Abbildung 16: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Plasmakontrollproben (Lagerung bei -20°C)

#### **Automatische Messung**

Wie oben beschrieben, unterlagen die dargestellten Ergebnisse der Kontrollproben einer gewissen Vorauswahl (siehe Punkt 3.8.1). Da Ausreißer entfernt wurden, entstand möglicherweise eine verzerrte Darstellung der Konzentrationen im Zeitverlauf.

Zum Vergleich wurden auch nach Erreichen der Analyseroutine gewonnene Daten dargestellt. Diese enthielten keine Ausreißer und unterlagen keiner Vorauswahl. Bei der routinemäßigen Ceruloplasminbestimmung wurden zur Überwachung der Messungen ebenfalls parallele Serum- und Plasmakontrollen untersucht.

In Abbildung 17 ist der Verlauf der Tagesmittelwerte der automatischen Serumkontrollen dargestellt. Die Regressionsanalyse lieferte die Gleichung y=-0,0399x+1787,6. Demnach fiel die Ceruloplasminkonzentration der Serumproben in 30 Tagen um ca. 1,2 mg /l ab. Abbildung 18 zeigt die Tagesmittelwerte der automatischen Plasmakontrollen. Die Regressionsanalyse lieferte die Gleichung y=-0,0426x+1955,0. Dies bedeutete eine Verringerung der Ceruloplasminkonzentration der Plasmaproben um ca. 1,3 mg /l in 30 Tagen.

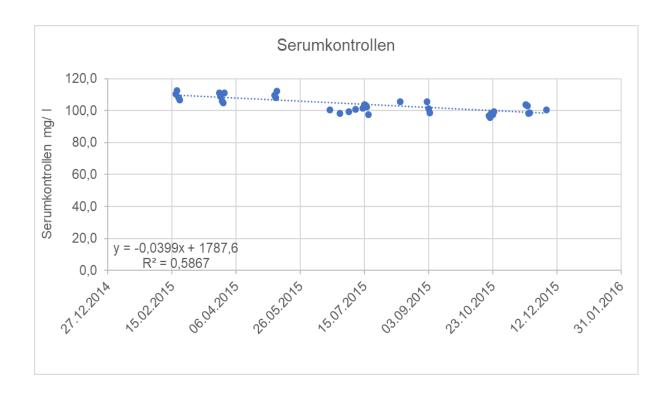


Abbildung 17: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Serumkontrollproben (Lagerung bei -20°C)

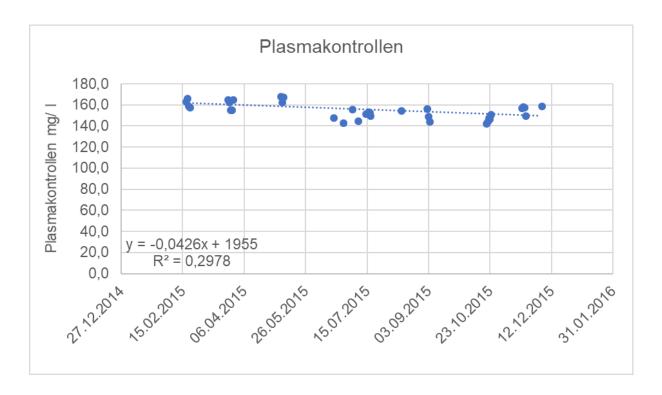


Abbildung 18: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Plasmakontrollproben (Lagerung bei -20°C)

Die nachfolgend dargestellte Auswertung der Kontrollproben nach Etablierung der automatischen Methode ergab ein ähnliches Bild. In Abbildung 19 ist der Verlauf der Tagesmittelwerte der automatischen Serumkontrollen dargestellt. Die Regressionsanalyse lieferte die Gleichung y= -0,0397x + 1793,2. Demnach fiel die Ceruloplasminkonzentration der Serumproben in 30 Tagen um ca. 1,2 mg /l ab. Abbildung 20 zeigt die Tagesmittelwerte der automatischen Plasmakontrollen. Die Regressionsanalyse lieferte die Gleichung y= -0,0358x + 1651,3. Dies bedeutete eine Verringerung der Ceruloplasminkonzentration der Plasmaproben um ca. 1,1 mg /l in 30 Tagen.

Tabelle 28 liefert eine Übersicht über den jeweiligen rechnerischen Verlust der Ceruloplasminkonzentration. Der betrachtete Zeitraum betrug 30 Tage. Dabei lagen die vor und nach der Etablierung der Methode gewonnen Ergebnisse eng beieinander.

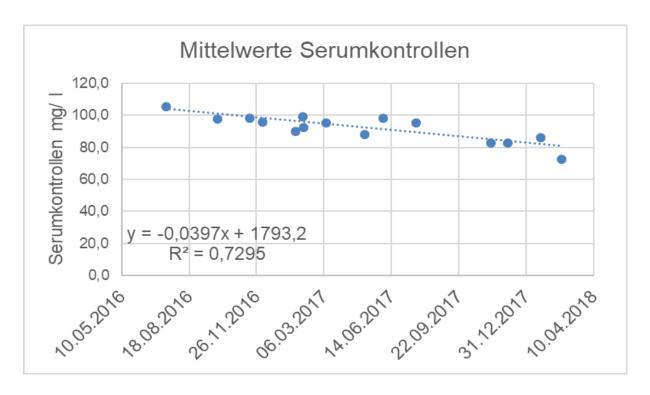


Abbildung 19: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der nach der Etablierung der automatischen Methode bestimmten Serumkontrollproben (Lagerung bei -20°C)

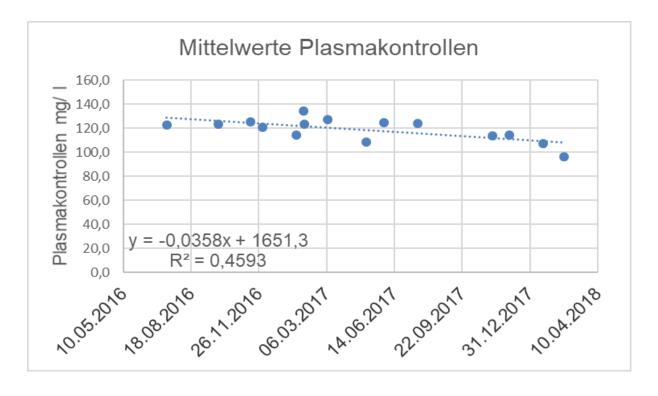


Abbildung 20: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der nach der Etablierung der automatischen Methode bestimmten Plasmakontrollproben (Lagerung bei -20°C)

Tabelle 28: rechnerischer Verlust der Cp- Konzentration verschiedener Proben bei Lagerung für 30 Tage bei -20°C

Probe	-Cp/ 30 Tage (mg/ I)	n
Serumkontrollen_m	1,3	28
Plasmakontrollen_m	2,7	28
Serumkontrollen_a	1,2	35
Plasmakontrollen_a	1,3	35
Serumkontrollen_a nach Etablierung der Methode	1,2	16
Plasmakontrollen_a nach Etablierung der Methode	1,1	16

<sup>-</sup>Cp/ 30 Tage (mg/ l): rechnerischer Verlust der Cp- Konzentration über 30 Tage n: Anzahl der Tagesmittelwerte der Kontrollproben

Bei ausschließlicher Betrachtung der Messung am Cobas Mira lag der rechnerische Konzentrationsverlust des Cp bei Lagerung im Tiefkühler (-20°C), über ein Jahr zwischen 13,1 – 15,5 mg/ I.

# 4.2.5 Lagerung der Proben mit Einfrier- Auftauzyklus (bei -20°C)

An Messtag 1 wurden sämtliche Proben aufgetaut, es wurde jedoch nur eine Probe (Doppelbestimmung) gemessen. Anschließend wurden alle Proben (außer der bereits analysierten) wieder bei -20°C eingefroren. Dieses Vorgehen wurde an den drei folgenden Tagen wiederholt (siehe 3.3.2). Die deskriptive Statistik lieferte die in der Tabelle 29 zusammengestellten Mittelwerte, Standardabweichungen, Mediane und die Minimum- und Maximumwerte an den Messtagen jeweils für die Serum- und Plasmawerte.

Tabelle 29: Cp- Messwerte aus der Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus (n= 10, in mg/ l)

MT	MW± SD	М	Min	Max	MW± SD	M	Min	Max
	Serum				Pla	sma		l
MT0	146± 27,4	149	106	198	174± 31,6 <sup>a</sup>	182	122	226
MT1	143± 25,9	147	103	189	176± 32,6 <sup>a,b</sup>	180	122	229
MT2	145± 25,6	154	105	190	181± 32,8°	184	131	235
MT3	145± 27,2	153	103	192	179± 32,2 <sup>c,d</sup>	183	127	229
MT4	143± 27,4	149	99	190	176± 31,2 <sup>a,b,d</sup>	180	127	230

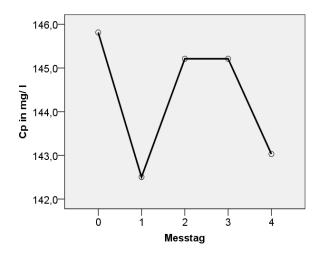
a,b,c,d verschiedene Indizes weisen auf Unterschiede auf dem Niveau p< 0,05 hin

Die ANOVA mit Messwiederholung mit Greenhouse- Geisser- Korrektur zeigte für die Serumproben, dass es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten gab, F(1,6; 14,4)= 2,8, p= 0,1.

Für die Plasmawerte wurde die Voraussetzung der Sphärizität nicht verletzt, F(4; 36) = 14.8, p< 0,001, partielles  $\eta^2 = 0.62$ . Es bestanden signifikante Unterschiede zwischen den Ceruloplasminkonzentrationen mindestens zweier Messtage. Es konnten 62 % der Varianzunterschiede zwischen den Messzeitpunkten auf die Lagerungsdauer bzw. die Einfrier-Auftauzyklen zurückgeführt werden.

Die paarweisen Vergleiche der Plasmaproben unter Verwendung der Bonferroni- Korrektur zeigten auf, zwischen welchen Gruppen die Unterschiede bestanden. Demnach waren die Ceruloplasminkonzentrationen des zweiten und dritten Messtages signifikant höher als die am Probenahmetag ermittelten Werte. Die Konzentration am ersten Messtag lag signifikant unter denen der Messtage 2 und 3. Außerdem war die Ceruloplasminkonzentration des zweiten Messtages signifikant höher als die des vierten.

Der zeitliche Verlauf der Ceruloplasminkonzentration über viermaliges Einfrieren und Auftauen der gelagerten Serum- und Plasmaproben ist den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.



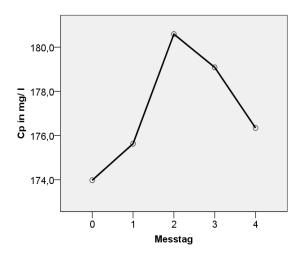


Abbildung 21: Verlauf der Serumwerte bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus

Abbildung 22: Verlauf der Plasmawerte bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus

Der Vergleich der Probentypen miteinander ergab auch hier ein signifikantes Ergebnis F(1; 18)= 6,2, p< 0,023, partielles  $\eta^2$ = 0,26. In Abbildung 23 ist ersichtlich, dass die Plasmaproben zu jedem Zeitpunkt über den jeweiligen Serumproben lagen. Dabei konnten 26 % der Varianzunterschiede der Gruppen über den Probentyp erklärt werden.

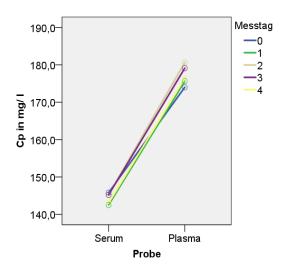


Abbildung 23: Vergleich der Serum- und Plasmawerte bei Lagerung mit Einfrier-Auftauzyklus

### 4.2.6 Vergleich der Lagerung der Proben bei Raumtemperatur und im Kühlschrank

Im grafischen Vergleich der Lagerungsbedingungen der Serumproben, lagen die Mittelwerte der bei Kühlschranktemperatur gelagerten Proben zu jedem Zeitpunkt über denen der bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (p= 0,783). Abbildung 24 zeigt den beschriebenen Zusammenhang.

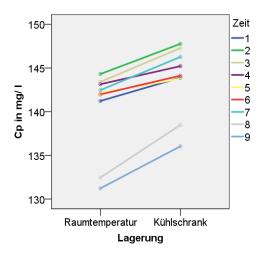


Abbildung 24: Vergleich der Serumproben bei Lagerung bei Raumtemperatur und im Kühlschrank

Die grafische Darstellung zur Lagerung der Plasmaproben (Abbildung 25) zeigte ein ähnliches Bild wie die der Serumproben. Auch hier lagen die Ceruloplasminkonzentrationen der bei Kühlschranktemperatur gelagerten Proben zum jeweiligen Zeitpunkt über den Werten der bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Die Analyse ergab in diesem Fall ebenso, dass der Unterschied nicht statistisch signifikant war (p= 0,808).

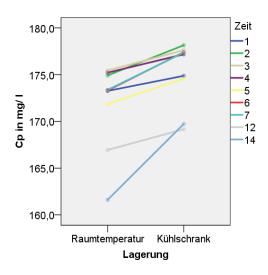


Abbildung 25: Vergleich der Plasmaproben bei Lagerung bei Raumtemperatur und im Kühlschrank

# 4.2.7 Vergleich der Lagerung der Proben bei Raumtemperatur, im Kühlschrank und bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus

Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied der (p=0,969Ceruloplasminkonzentrationen hinsichtlich der Lagerung bei Raumtemperatur, Kühlschranktemperatur oder dem viermaligen Einfrieren und Auftauen der Serumproben. Dies galt für die ersten vier Messtage. Die Konzentrationen an den verschiedenen Messtagen unter den jeweiligen Lagerungsbedingungen sind in den Abbildungen 26 und 27 grafisch dargestellt. An den ersten drei Messtagen waren die Ceruloplasminkonzentrationen der Raumtemperatur gelagerten Serumproben am geringsten. Die Konzentrationen Kühlschranklagerung höchsten. Dazwischen waren am lagen die Ceruloplasminkonzentrationen der eingefrorenen und aufgetauten Proben. Am vierten Messtag waren die Konzentrationen der eingefrorenen und aufgetauten Proben am niedrigsten, gefolgt von den bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Die höchsten Konzentrationen wiesen die bei Kühlschranktemperatur gelagerten Proben auf.

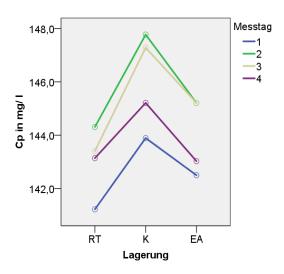


Abbildung 26: Vergleich der Serumproben bei Lagerung bei Raumtemperatur, im Kühlschrank und bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus

Abbildung 27 zeigt die grafische Darstellung der Ceruloplasminkonzentrationen der Plasmaproben an den ersten vier Messtagen unter den jeweiligen Lagerungsbedingungen. Die Konzentrationen waren an den Messtagen 1 bis 3 für die bei Raumtemperatur gelagerten Proben am geringsten. Am höchsten waren sie bei den mehrfach eingefrorenen und aufgetauten Proben. Dazwischen lagen die Werte der bei Kühlschranktemperatur gelagerten Proben. An Messtag 4 stiegen die Werte ebenfalls von den bei Raumtemperatur gelagerten Proben zu den bei Kühlschranktemperatur gelagerten Proben an. Dazwischen lagen hier die Konzentrationen für die eingefrorenen und aufgetauten Proben. Die genannten Unterschiede waren für diesen Zeitraum jedoch nicht statistisch signifikant (p= 0,974).

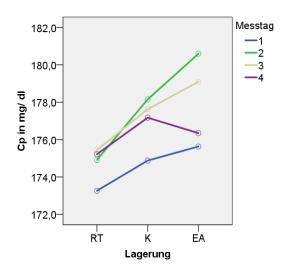


Abbildung 27: Vergleich der Plasmaproben bei Lagerung bei Raumtemperatur, im Kühlschrank und bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus

# 4.3 Auswertung der Betriebe

#### **Manuelle Messung**

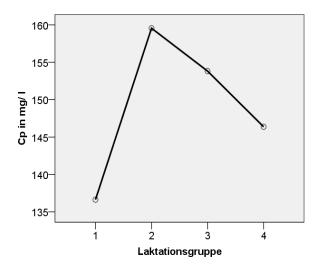
Die Analyse der Betriebe ergab die in der Tabelle 30 angegebenen Werte für die Spannweiten, Konfidenzintervalle, Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Laktationsgruppen. Zwischen mindestens zwei Gruppen der Serumproben bestand ein signifikanter Unterschied in der Ceruloplasminkonzentration, F(3, 151)= 8,1, p< 0,001. Bei den Plasmaproben gab es ebenfalls einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen, F(3, 149)= 8,6, p< 0,001.

Tabelle 30: Parameter aus den Messungen der Betriebe mit der manuellen Methode (Cp- Konzentration in mg/ I)

Parameter	3-0 Wo a. p.	0-1 Wo p. p.	3-5 Wo p. p.	15-18 Wo p. p.					
		Serumproben (mg/ l)							
Stichprobengröße	41	43	38	33					
Mittelwert ± SD	137± 24,1 <sup>a</sup>	160± 22,6 <sup>b</sup>	154± 21,1 <sup>b,c</sup>	146± 21,2 <sup>a,b,c</sup>					
95 % KI	129 – 144	153 – 167	147 – 161	139 - 154					
Spannweite	89 – 191	118 – 212	106 – 195	111 - 186					
		Plasmapro	oben (mg/ l)						
Stichprobengröße	41	40	39	33					
Mittelwert ± SD	197± 27,0 <sup>a</sup>	227± 31,6 <sup>b</sup>	211± 22,1 <sup>a,b,c</sup>	209± 22,1 <sup>a,c</sup>					
95 % KI	189 – 206	217 – 237	204 – 218	201 - 217					
Spannweite	122 – 248	162 – 296	166 – 270	158 - 253					

a,b,c verschiedene Indizes weisen auf Unterschiede auf dem Niveau p< 0,05 hin

Die Abbildungen 28 und 29 veranschaulichen die Lage der Mittelwerte der Serum- und Plasmaproben der einzelnen Laktationsgruppen grafisch.



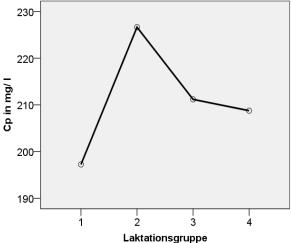


Abbildung 28: Mittelwerte der Cp-Konzentration in Serumproben nach Laktationsgruppen aus den Messungen der Betriebe mit der manuellen Methode

Abbildung 29: Mittelwerte der Cp-Konzentration in Plasmaproben nach Laktationsgruppen aus den Messungen der Betriebe mit der manuellen Methode

Die Serumceruloplasminkonzentrationen der ersten Laktationsgruppe, also der Rinder vor der Kalbung, waren geringer als die der anderen Laktationsgruppen. Signifikant war dieser Unterschied jedoch nur zwischen der ersten und zweiten bzw. dritten Laktationsgruppe. Die Laktationsgruppen 2, 3 und 4 unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Grundsätzlich war der Konzentrationsverlauf der Plasmaproben ähnlich. Jedoch unterschied sich die zweite Laktationsgruppe nur signifikant von Gruppe 1 und 4. Der niedrigste Wert war in Laktationsgruppe 1 zu finden, allerdings unterschieden sich die Gruppen 1, 3 und 4 nicht statistisch signifikant voneinander. Zwischen Gruppe 3 und 4 bestand ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Die Ceruloplasminkonzentrationen stiegen also zum Geburtstermin hin an und fielen nach der Kalbung wieder ab. Dies war sowohl bei den Serum- als auch den Plasmaproben zu beobachten.

Der Vergleich der Serum- und Plasmakonzentrationen ergab, dass sich die Probentypen signifikant voneinander unterschieden, F(1, 300) = 493,3, p< 0,001, partielles  $\eta^2 = 0,62$ .

Zu jedem gemessenen Zeitpunkt der Laktation lagen die Plasmawerte über denen des Serums. Abbildung 30 stellt den Verlauf grafisch dar.

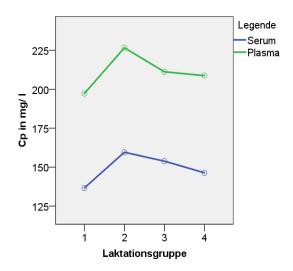


Abbildung 30: Vergleich der Mittelwerte der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der mit der manuellen Methode gemessenen Proben der Betriebe nach Laktationsgruppen

### **Automatische Messung**

Die Analyse der Betriebe ergab die in der Tabelle 31 angegebenen Werte für die Spannweiten, Konfidenzintervalle, Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Laktationsgruppen. Zwischen mindestens zwei Gruppen bestanden bezüglich der Serumproben signifikante Unterschiede in der Ceruloplasminkonzentration, F(3, 151)= 10,3, p< 0,001.

Bei den Plasmaproben gab es ebenfalls einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen mindestens zwei Gruppen, F(3, 149)= 7,6, p< 0,001.

Tabelle 31: Parameter aus den Messungen der Betriebe mit der automatischen Methode (Cp- Konzentration in mg/ I)

Parameter	3-0 Wo a. p.	0-1 Wo p. p.	3-5 Wo p. p.	15-18 Wo p. p.				
		Serumproben						
Stichprobengröße	41	43	38	33				
Mittelwert ± SD	103± 18,4 <sup>a</sup>	123± 18,8 <sup>b,</sup>	120± 17,1 <sup>b,c</sup>	113± 16,9 <sup>a,b,c</sup>				
95 % KI	97 – 109	118 – 129	114 – 125	107 – 119				
Spannweite	71 – 144	90 – 165	86 – 153	89 – 150				
		Plasma	aproben					
Stichprobengröße	41	40	39	33				
Mittelwert ± SD	145± 21,7 <sup>a</sup>	166± 21,8 <sup>b</sup>	159± 17,5 <sup>b,c</sup>	155± 20,8 <sup>a,b,c</sup>				
95 % KI	138 – 151	159 – 173	153 – 164	148 – 162				
Spannweite	95 – 204	126 – 208	124 – 194	121 – 213				

a,b,c, verschiedene Indizes weisen auf Unterschiede auf dem Niveau p< 0,05 hin

Die Abbildungen 31 und 32 veranschaulichen die Lage der Mittelwerte der Serum- und Plasmaproben der einzelnen Laktationsgruppen grafisch.

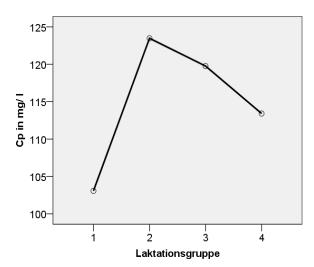


Abbildung 31: Mittelwerte der Cp-Konzentration in Serumproben nach Laktationsgruppen aus den Messungen der Betriebe mit der automatischen Methode

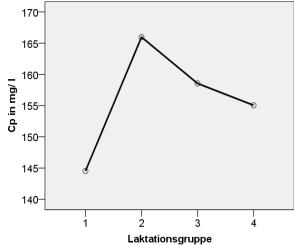


Abbildung 32: Mittelwerte der Cp-Konzentration in Plasmaproben nach Laktationsgruppen aus den Messungen der Betriebe mit der automatischen Methode

Sowohl in den Serum- als auch den Plasmaproben waren die Ceruloplasminkonzentrationen vor der Kalbung am niedrigsten. Die Werte stiegen auf die höchsten Konzentrationen direkt nach der Geburt, um schließlich wieder zu fallen. Laktationsgruppe 1 unterschied sich signifikant von den Laktationsgruppen 2 und 3. Die Konzentrationen der zweiten lagen über denen der dritten und vierten Gruppe, jedoch nicht signifikant.

Der Vergleich der Serum- und Plasmakonzentrationen ergab, dass sich die Probentypen signifikant voneinander unterschieden, F(1, 300) = 347,7, p< 0,001, partielles  $\eta^2 = 0,54$ .

Zu jedem gemessenen Zeitpunkt der Laktation lagen die Plasmawerte über denen des Serums. Die Abbildung 33 stellt die Verläufe grafisch dar.

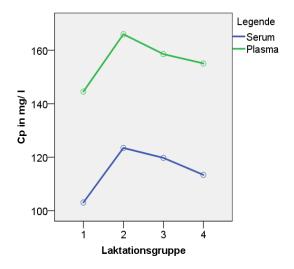


Abbildung 33: Vergleich der Mittelwerte der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der mit der automatischen Methode gemessenen Proben der Betriebe nach Laktationsgruppen

# 4.4 Methodenvergleich

# 4.4.1 Bestimmung des Pearson- Korrelationskoeffizienten zum Vergleich der manuellen und automatischen Methode

Zum Vergleich der Messmethoden wurden unter anderem die Korrelationen der Serum- und Plasmawerte der parallel mit beiden Methoden gemessenen Betriebe herangezogen. Tabelle 32 fasst die Pearson- Korrelationen der verschiedenen Paare zusammen.

Tabelle 32: Pearson- Korrelationen verschiedener Wertepaare aus den Messungen der Betriebe

Wertepaar	n	I	r		р					
		gesamt/ über alle Laktationsgruppen								
S_m/ S_a	155	0,9	922		p< 0,001					
P_m/ P_a	153	0,8	368		p< 0,001					
	n	r	р	n	r	р				
	Lak	tationsgrupp	pe 1	Laktationsgruppe 2						
S_m/ S_a	41	0,916	p< 0,001	43	0,911	p< 0,001				
P_m/ P_a	41	0,868	p< 0,001	40	0,846	p< 0,001				
	Lak	tationsgrupp	oe 3	Lak	tationsgrup	oe 4				
S_m/ S_a	38	0,900	p< 0,001	33	0,913	p< 0,001				
P_m/ P_a	39	0,846	p< 0,001	33	0,859	p< 0,001				

S\_m: Serumwerte der manuellen Messung; P\_m: Plasmawerte der manuellen Messung; S\_a; Serumwerte der automatischen Messung; P\_a: Plasmawerte der automatischen Messung

Grundsätzlich waren die Korrelationen zwischen den manuell und automatisch gemessenen Bestandswerten hoch. Sämtliche Korrelationskoeffizienten lagen über 0,84. Die Korrelation der Serumwerte war in jeder Gruppe höher als die der entsprechenden Plasmawerte.

Die Abbildungen 34/35 und 36/37 veranschaulichen diesen Zusammenhang grafisch. Da die Korrelationskoeffizienten über die Werte aller Betriebe und der einzelnen Laktationsgruppen sehr ähnlich waren, werden exemplarisch die Ergebnisse der Gesamtwerte dargestellt.

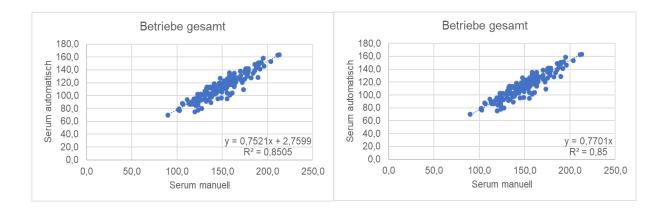


Abbildung 34: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Serumwerte der Betriebsmessungen (n= 155)

Abbildung 35: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Serumwerte der Betriebsmessungen – mit Schnittpunkt Nullpunkt (n= 155)

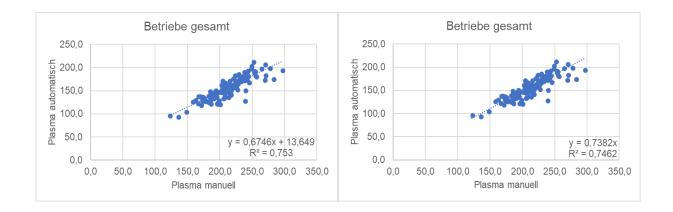


Abbildung 36: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Plasmawerte der Betriebsmessungen (n= 153)

Abbildung 37: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Plasmawerte der Betriebsmessungen – mit Schnittpunkt Nullpunkt (n= 153)

Die Gesamtwerte der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Cp-Konzentrationen der Betriebe sind in Tabelle 33 zusammengefasst.

Tabelle 33: Gesamtwerte der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Cp- Konzentrationen der Betriebe (in mg/ l)

Parameter	Serum	Plasma	Serum	Plasma	
Methode	Mar	nuell	Automatisch		
n	155	153	155	153	
MW	149	211	115	156	
SD	23,8	28,1	19,4	21,8	

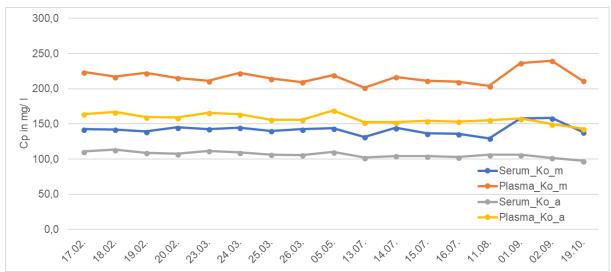
#### 4.4.2 Korrekturfaktor

Damit die Werte der automatischen Messung mit denen der manuellen Methode verglichen werden konnten, war der Einsatz eines Korrekturfaktors sinnvoll. Unter Punkt 3.5.2 wurde ein theoretischer Korrekturfaktor von 1,74 ermittelt. Dieser sollte mit tatsächlichen Faktoren, die aus den Betriebs- und Kontrollwerten errechnet wurden, verglichen werden.

#### Kontrollwerte

Es wurden die Tagesmittelwerte der Kontrollmessungen herangezogen, wenn an einem Tag sowohl mit der manuellen als auch der automatischen Methode gemessen wurde.

In Abbildung 38 sind die manuellen den parallel automatisch gemessenen Kontrollwerten gegenübergestellt.



Serum\_Ko\_m: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Serumkontrollproben

Plasma\_Ko\_m: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Plasmakontrollproben

Serum\_Ko\_a: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Serumkontrollproben

Plasma\_Ko\_a: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Plasmakontrollproben

Betrachtungszeitraum: 17.02.-19.10.2015

# Abbildung 38: Vergleich der Verläufe der parallel mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Kontrollproben (ohne Faktor)

Aus dem Verhältnis der manuellen und automatischen Kontrollwerte, ergab sich ebenfalls ein Faktor. Dieser konnte mit dem theoretischen Faktor verglichen werden.

Wie unter Punkt 4.1.1 beschrieben, kam es bei den mit der automatischen Methode bestimmten Kontrollen vom 05.05. auf den 17.06. zu einem Abfall in der Cp- Konzentration. Wurde dieser bei der Berechnung des Korrekturfaktors nicht berücksichtigt, ergab sich ein anderer Faktor als bei der Berücksichtigung der sprunghaften Veränderung.

Über den gesamten Zeitraum betrachtet ergab sich für die Serumkontrollen ein Korrekturfaktor von 1,33. Die Plasmakonzentrationen der automatischen Messung konnten, um den Faktor 1,38 erhöht, mit den Plasmakontrollen der manuellen Messung verglichen werden.

Für den Zeitraum vom 17.02.- 05.05. betrug der Faktor für die Serumkontrollen 1,30 bzw. 1,34 für die Plasmawerte. Um die Serum- und Plasmawerte der automatischen Messung des zweiten Zeitraumes (13.07.- 19.10.) mit denen der manuellen Messung vergleichen zu können, mussten diese jeweils um den Faktor 1,37 bzw. 1,42 erhöht werden.

Somit lagen die beiden Faktoren des gesamten Zeitraums etwa zwischen denen, die sich ergaben, wenn der Zeitraum aufgeteilt wurde.

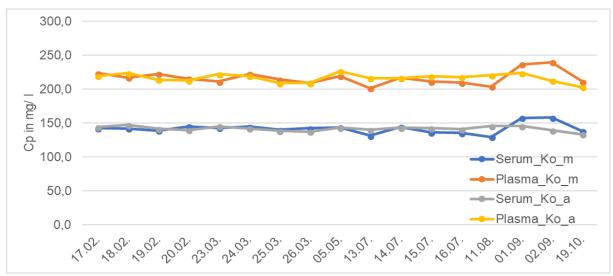
Für beide Fälle sind die Korrekturfaktoren in Tabelle 34 angegeben.

Tabelle 34: errechnete Korrekturfaktoren aus den Ergebnissen der Kontrollmessungen mit der manuellen und automatischen Methode (17.02.-19.10.2015)

	Serun	nkontrollen	(mg/ l)	Plasmakontrollen (mg/ l)			
Zeitraum	17.02	17.02	13.07	17.02	17.02	13.07	
	19.10.	05.05.	19.10.	19.10.	05.05.	19.10.	
n	17	9	8	17	9	8	
			Manuelle	Methode			
MW	142	143	142	217	217	216	
SD	7,5	2,0	11,1	10,1	5,1	14,3	
			Automatisc	he Methode			
MW	106	109	103	158	162	152	
SD	4,1	2,5	2,8	6,8	4,8	4,4	
			•				
Faktor	1,33	1,30	1,37	1,38	1,34	1,42	

Faktor: Faktor= MW manuelle Messung/ MW automatische Messung

Abbildung 39 zeigt den Verlauf der Serum- und Plasmakontrollen der manuellen und automatischen Methode. Die Werte der automatischen Messungen wurden mit den Korrekturfaktoren der jeweiligen Zeiträume bearbeitet.



Serum\_Ko\_m: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Serumkontrollproben

Plasma\_Ko\_m: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Plasmakontrollproben

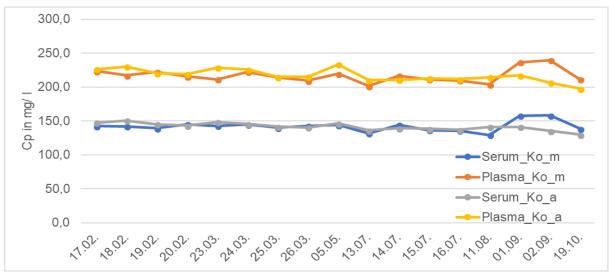
Serum\_Ko\_a: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Serumkontrollproben

Plasma\_Ko\_a: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Plasmakontrollproben

Betrachtungszeitraum: 17.02.-19.10.2015

# Abbildung 39: Vergleich der Verläufe der parallel mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Kontrollproben (mit Faktor geteilt)

Abbildung 40 zeigt den Verlauf der Serum- und Plasmakontrollen der manuellen und automatischen Methode, jedoch wurden die Werte hier mit dem Korrekturfaktor des Gesamtzeitraumes berechnet.



Serum\_Ko\_m: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Serumkontrollproben

Plasma\_Ko\_m: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der manuellen Methode bestimmten Plasmakontrollproben

Serum\_Ko\_a: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Serumkontrollproben

Plasma\_Ko\_a: Verlauf der Cp- Konzentration der mit der automatischen Methode bestimmten Plasmakontrollproben

Betrachtungszeitraum: 17.02.-19.10.2015

Abbildung 40: Vergleich der Verläufe der parallel mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Kontrollproben (mit Gesamtfaktor)

Eine separate Berücksichtigung der Zeiträume führte zu ähnlichen Ergebnissen wie die Betrachtung des Gesamtzeitraumes.

Die ermittelten Faktoren der Kontrollmessungen lagen unter dem theoretischen Faktor von 1,74.

#### Betriebsmessungen

In Tabelle 35 sind die Ergebnisse der gemessenen Betriebe zusammengefasst. Zudem ist ein errechneter Korrekturfaktor angegeben, der wie folgt bestimmt wurde: F= Mittelwert der Messungen der Betriebe mit der manuellen Methode/ Mittelwert der Messungen der Betriebe mit der automatischen Methode. Dabei wurden sowohl die Gesamtmittelwerte der Serum- und Plasmaproben als auch die Mittelwerte der einzelnen Laktationsgruppen separat berücksichtigt.

Tabelle 35: errechnete Korrekturfaktoren aus den Ergebnissen der Betriebsmessungen mit der manuellen und automatischen Methode

	Serum (mg/ I)						Pla	sma (m	g/ I)	
n	42	43	38	33	155	41	40	39	33	153
				I	Manuelle	Methode	9			
LG	L1	L2	L3	L4	ges	L1	L2	L3	L4	ges
MW	137	160	154	146	149	197	227	211	209	211
SD	24,1	22,6	21,1	21,2	23,8	27,0	31,6	22,1	22,1	28,1
				Au	tomatisch	e Metho	ode			
LG	L1	L2	L3	L4	ges	L1	L2	L3	L4	ges
MW	103	123	120	113	115	145	166	159	155	156
SD	18,4	18,8	17,1	16,9	19,4	21,7	21,8	17,5	20,8	21,8
F	1,33	1,30	1,28	1,29	1,30	1,36	1,37	1,33	1,35	1,35

LG: Laktationsgruppe, L1- L4: Laktationsgruppe 1- Laktationsgruppe 4

ges: Gesamtwert Serum/ Plasma

F: errechneter Faktor aus dem Wert der manuellen Messung/ Wert der automatischen Messung

Die errechneten tatsächlichen Faktoren aus den Betriebsmessungen lagen zwischen 1,28 und 1,38 und somit alle unter dem theoretischen Korrekturfaktor von 1,74.

#### 4.4.3 Bland- Altman- Analyse

Um neben dem Zusammenhang auch den Grad der Übereinstimmung zwischen den Methoden zu untersuchen, wurde ein Bland- Altman Plot erstellt.

#### Kontrollwerte

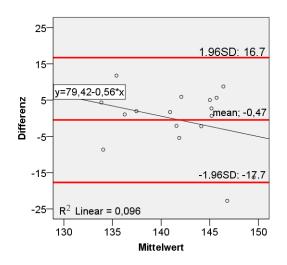
Zunächst wurde diese Untersuchung für die Kontrollwerte durchgeführt, die auch für die Ermittlung des Korrekturfaktors genutzt wurden. Dabei fanden die Kontrollen der manuellen und die Kontrollen der automatischen Messungen Verwendung. Die Serumkontrollen wurden mit dem Faktor 1,33 und die Plasmakontrollen mit dem Faktor 1,38 multipliziert (siehe Punkt 4.4.2). Anschließend erfolgte die Ermittlung der Differenz zwischen den mit der automatischen und manuellen Methode ermittelten Konzentrationen. Tabelle 36 zeigt einige statistische Größen und die Abbildungen 41 bis 42 stellen die entsprechenden Bland- Altman- Grafiken dar.

Tabelle 36: statistische Größen zur Bland- Altman- Analyse der Kontrollproben (MW Differenz (\_a - \_m) in mg/ l)

Vergleich	n	MW± SD Differenz	t-Test p	UG	OG	b	p_b
SKo* 1,33	17	-0,5± 8,78	0,828	-17,7	16,7	-0,563	0,226
PKo* 1,38	17	0,5± 12,83	0,876	-24,7	25,6	-0,134	0,770

SKo\* 1,33: Serumkontrollproben mit dem oben ermittelten Korrekturfaktor von 1,33 multipliziert PKo\* 1,38: Plasmakontrollproben mit dem oben ermittelten Korrekturfaktor von 1,38 multipliziert

UG: untere Grenze= MW - 1,96s; OG: Obere Grenze= 1,96s + MW



35-1,96SD; 25,6 25 15-5y=29,51-0,13\*x mean: 0.49 -5 -15--1.96SD°-24.7 -25  $-35 - R^2$  Linear = 0,006 200 205 210 215 220 225 230 Mittelwert

Abbildung 41: Bland- Altman- Grafik der Serumkontrollen

Abbildung 42: Bland- Altman- Grafik der Plasmakontrollen

Der Mittelwert der Differenzen der Serumproben betrug -0,47 und der der Plasmaproben 0,49. Nach dem t- Test unterschieden sich die Mittelwerte der Differenzen nicht signifikant von null. Der in den Abbildungen 41 und 42 ersichtliche Trend war nicht statistisch signifikant.

#### **Betriebswerte**

Die Ergebnisse der manuellen und automatischen Bestandsmessungen wurden ebenfalls mit Hilfe des Bland- Altmann- Diagramms analysiert. Es erfolgte die Untersuchung der Ceruloplasminkonzentrationen ohne Faktor und nach Multiplikation mit den oben ermittelten Faktoren von 1,30 für die Serum- und 1,35 für die Plasmaproben.

In Tabelle 37 sind wichtige Größen zusammengestellt. Die Mittelwerte der Differenzen aus den mit der manuellen und automatischen Methode durchgeführten Messungen unterschieden

sich statistisch signifikant voneinander. Für die untersuchten Serumproben lagen die mit dem automatischen Verfahren ermittelten Konzentrationen im Mittel ca. 34 mg/ I unter den mit der manuellen Methode gemessenen Ceruloplasminkonzentrationen. Entsprechend waren die mit dem automatischen Verfahren ermittelten Plasmakonzentrationen etwa 55 mg/ I geringer als die mit der manuellen Methode gemessenen Werte. Für beide Probentypen war ein signifikanter Trend nachweisbar. Unter der Annahme, dass sich die Methoden über den Konzentrationsbereich um einen festen Prozentsatz unterschieden, erschien es logisch, dass mit steigender Konzentration auch die Differenzen anstiegen.

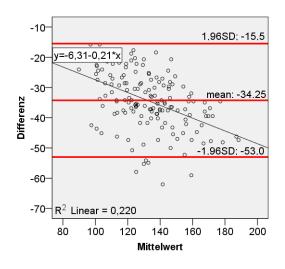
Tabelle 37: statistische Größen zur Bland- Altman- Analyse der Betriebsproben (MW Differenz (\_a - \_m) in mg/ I)

Vergleich	n	MW± SD Differenz	t-Test p	UG	OG	b	p_b
Betriebe S	155	-34,3± 9,57	<0,001	-53,0	-15,5	-0,211	<0,001
Betriebe P	153	-55,0± 14,19	<0,001	-82,8	-27,2	-0,268	<0,001
Betriebe S* 1,30	155	0,3± 9,79	0,745	-18,9	19,4	0,061	0,064
Betriebe P* 1,35	153	-0,4± 14,86	0,741	-29,5	28,7	0,052	0,233

<sup>1,30</sup> und 1,35 entsprechen den oben ermittelten Korrekturfaktoren der Serum- und Plasmaproben

UG: untere Grenze= MW - 1,96s; OG: Obere Grenze= 1,96s + MW

Die Abbildungen 43 und 44 zeigen Bland- Altman- Diagramme der Serum- und Plasmawerte ohne Anwendung eines Faktors.



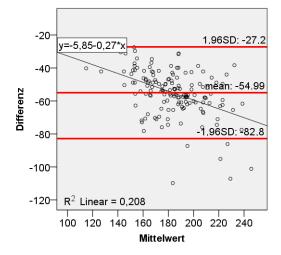
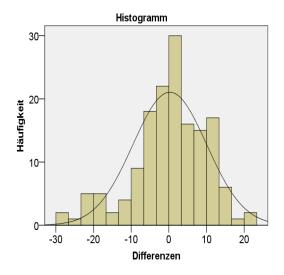


Abbildung 43: Bland- Altman- Grafik der Serumwerte der Betriebsmessungen, ohne Faktor

Abbildung 44: Bland- Altman- Grafik der Plasmawerte der Betriebsmessungen, ohne Faktor

Die Differenzen aus den mit den Korrekturfaktoren bearbeiteten Ergebnissen der Betriebsmessungen wiesen keine Normalverteilung auf. In den Abbildungen 45/46 und 47/48 sind die entsprechenden Histogramme und Q- Q- Diagramme dargestellt. Sie zeigten eine ausreichende Annäherung an eine Normalverteilung, so dass die Analyse durchgeführt werden konnte.



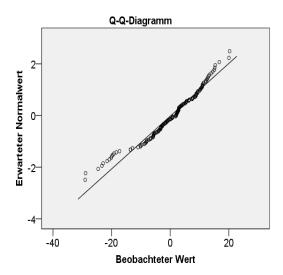
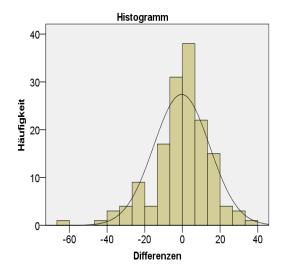


Abbildung 45: Histogramm mit Normalverteilungskurve der Differenzen der Serumwerte aus den Betriebsmessungen

Abbildung 46: Q- Q- Diagramm der Differenzen der Serumwerte aus den Betriebsmessungen



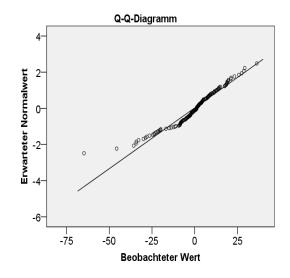
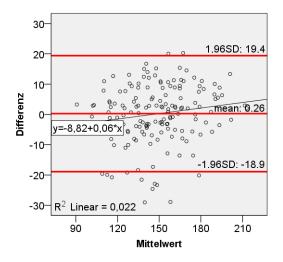


Abbildung 47: Histogramm mit Normalverteilungskurve der Differenzen der Plasmawerte aus den Betriebsmessungen

Abbildung 48: Q- Q- Diagramm der Differenzen der Plasmawerte aus den Betriebsmessungen

Die Mittelwerte der Differenzen sowohl der Serum- als auch der Plasmaproben unterschieden sich nicht statistisch signifikant von null. Zudem war für beide Probenarten kein signifikanter Trend in den Differenzen nachweisbar.

Die Abbildungen 49 und 50 zeigen die entsprechenden Bland- Altman- Diagramme.



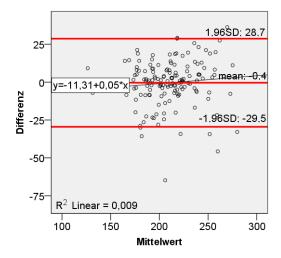


Abbildung 49: Bland- Altman- Grafik der Serumwerte der Betriebsmessungen nach Anpassung mit dem Korrekturfaktor 1,30

Abbildung 50: Bland- Altman- Grafik der Plasmawerte der Betriebsmessungen nach Anpassung mit dem Korrekturfaktor 1,35

In Tabelle 38 sind die 95 %- Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Differenzen angegeben. Die Nulllinien der Differenzen der Kontroll- und mit den Faktoren multiplizierten Betriebswertenwerte, wurden jeweils von diesen umschlossen. Bei den unkorrigierten Betriebsmessungen lag die Nulllinie der Differenzen jeweils weit außerhalb des 95 %-Konfidenzintervalls.

Tabelle 38: 95 %- Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Differenzen aus den Bland-Altman- Analysen der Kontroll- und Betriebsmessungen (in mg/ l)

Vergleich	n	MW± SD Differenzen	95 % KI MW Differenzen
SKo* 1,33	17	-0,5± 8,78	-5,0 – 4,0
PKo* 1,38	17	0,5± 12,83	-6,1 – 7,1
Betriebe S	155	-34,3± 9,57	-35,8 – (-32,7)
Betriebe P	153	-55,0± 14,19	-57,3 – (-52,7)
Betriebe S* 1,30	155	0,3± 9,79	-1,3 – 1,8
Betriebe P* 1,35	153	-0,4± 14,86	-2,8 – 2,0

SKo\* 1,33: Serumkontrollproben mit dem oben ermittelten Korrekturfaktor von 1,33 multipliziert PKo\* 1,38: Plasmakontrollproben mit dem oben ermittelten Korrekturfaktor von 1,38 multipliziert

#### 4.5 Serum/ Plasma

Tabelle 39 zeigt einen Vergleich zwischen Serum und Plasma bzw. den Quotienten aus Plasma/ Serum für die Werte der Betriebsmessungen insgesamt und aufgeschlüsselt nach den Laktationsgruppen. In den Abbildungen 51 und 52 sind die Werte der manuellen und in den Abbildungen 53 und 54 die Werte der automatischen Messung mit Regressionsgleichungen dargestellt. Aus den in Tabelle 39 angegebenen Mittelwerten ergaben sich Verhältnisse vom Plasma zum Serum von 1,43 für die mit dem manuellen Verfahren gemessenen Betriebsproben und 1,37 für die mit der automatischen Methode bestimmten Werte. Ähnliche Ergebnisse ließen sich aus den Abbildungen 52 und 54 ableiten.

Tabelle 39: Gegenüberstellung der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der Betriebsmessungen, jeweils für das manuelle und automatische Messverfahren (Serum/ Plasma in mg/ l± SD)

	Serum	Plasma	P/S	n	Serum	Plasma	P/S	n
	Betrie	be Messung	Betriebe	Messung au	tomatisc	ch		
Ges	147± 22,2	210± 28,2	1,43	145	113± 18,2	155± 21,8	1,37	145
L1	135± 23,1	196± 27,4	1,45	38	101± 17,1	143± 22,1	1,42	38
L2	156± 20,2	225± 30,9	1,44	39	121± 16,9	165± 21,4	1,36	39
L3	152± 19,3	211± 22,8	1,39	36	118± 15,9	158± 17,5	1,34	36
L4	145± 20,4	208± 21,9	1,43	32	113± 16,7	154± 20,6	1,36	32

Ges: umfasst alle Betriebe; L1- L4: Laktationsgruppe 1 bis 4

<sup>1,30</sup> und 1,35 entsprechen den oben ermittelten Korrekturfaktoren der Serum- und Plasmaproben der Betriebsmessungen

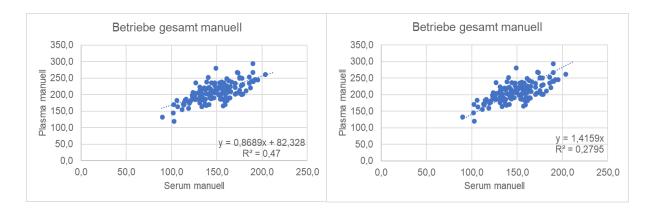


Abbildung 51: Vergleich der Cp-Konzentrationen in Serum und Plasma der Konzentrationen in Serum und Plasma der Betriebsmessungen; bestimmt mit der manuellen Methode (n= 145)

Abbildung 52: Vergleich der Cp-Betriebsmessungen; bestimmt mit der manuellen Methode (n= 145) - mit Schnittpunkt Nullpunkt

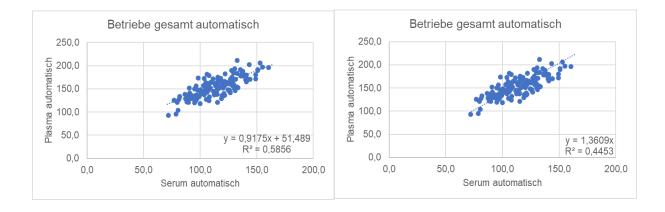


Abbildung 53: Vergleich der Cp-Betriebsmessungen; bestimmt mit der automatischen Methode (n= 145)

Abbildung 54: Vergleich der Cp-Konzentrationen in Serum und Plasma der Konzentrationen in Serum und Plasma der Betriebsmessungen; bestimmt mit der automatischen Methode (n= 145) - mit Schnittpunkt Nullpunkt

Aus Tabelle 40 ist ersichtlich, dass die entsprechenden Quotienten der Daten aus dem Lagerungsversuch deutlich niedriger waren.

Tabelle 40: Gegenüberstellung der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der Messungen des Lagerungsversuches (Serum/ Plasma in mg/ l± SD; n=10)

MT	Serum	Plasma	P/S	Serum	Plasma	P/S	
	Lagerungsver	such Raumtem	peratur	eratur Lagerungsversuch Kühl			
0	146± 27,4	174± 31,6	1,19	146± 27,4	174± 31,6	1,19	
1	141± 28,0	173± 31,5	1,23	144± 27,4	175± 32,1	1,22	
2	144± 27,9	175± 30,8	1,22	148± 27,7	178± 32,9	1,20	
3	143± 28,3	175± 30,9	1,22	147± 29,1	178± 31,5	1,21	
4	143± 27,4	175± 30,8	1,22	145± 27,3	177± 32,1	1,22	
5	142± 27,4	172± 29,1	1,21	144± 26,8	44± 26,8 175± 31,4		
6	142± 27,5	173± 30,0	1,22	144± 28,4	177± 31,7	1,23	
7	143± 27,4	173± 30,1	1,21	146± 28,6	177± 31,3	1,21	
12	133± 24,5	167± 28,4	1,26	139± 27,0	169± 27,9	1,22	
14	131± 24,9	162± 25,9	1,24	136± 24,0	170± 28,7	1,25	
	Lagerungsve	rsuch Einfriere	n/ Auftaue	en			
0	146± 27,4	174± 31,6	1,19				
1	143± 25,9	176± 32,6	1,23				
2	145± 25,6	181± 32,8	1,25				
3	145± 27,2	179± 32,2	1,23				
4	143± 27,4	176± 31,2	1,23				

MT: Messtag

# 4.6 Einzelwerte/ Poolproben

Es wurden die Mittelwerte der Konzentrationen der Einzelmessungen mit den Ergebnissen der daraus hergestellten Poolproben verglichen. Diese Untersuchung erfolgte aus Plasmaproben. Da sich die Zeitpunkte der Messungen der Einzelwerte teilweise erheblich von denen der gepoolten Betriebswerte unterschieden, wurde auch die theoretische Auswirkung der Lagerungsdauer betrachtet. Dazu wurde der zeitliche Abstand zwischen den Messzeitpunkten in Tagen bestimmt und mit dem Faktor -0,0426 multipliziert. Danach erfolgte eine Anpassung der Ceruloplasminkonzentration (siehe Punkt 4.2.4).

Zudem wurden die jeweiligen Korrelationskoeffizienten bestimmt. Diese sind in Tabelle 41 dargestellt.

Tabelle 41: Korrelationskoeffizienten nach Pearson aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe und den entsprechenden Poolproben

Paar	r	р	n
Einzelwerte/ Betriebe	0,753	p< 0,001	148
Einzelwerte/ Betriebe korrigiert <sup>1</sup>	0,792	p< 0,001	148

<sup>1:</sup> d. h. der theoretische Verlust der Ceruloplasminkonzentration während der Lagerungsdauer zwischen den Messzeitpunkten wurde berücksichtigt

Die Berücksichtigung der Lagerungsdauer führte zu einem etwas höheren Korrelationskoeffizienten. In den Abbildungen 55 und 56 ist die entsprechende Regressionsgerade ersichtlich. Hier war die Übereinstimmung unter Berücksichtigung der Lagerungsdauer ebenfalls etwas höher.

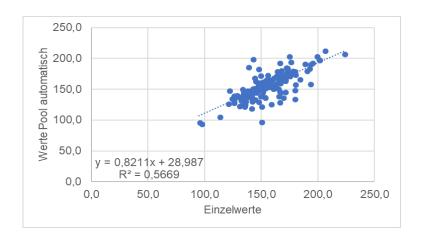


Abbildung 55: Regressionsgerade aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe und den entsprechenden Poolproben

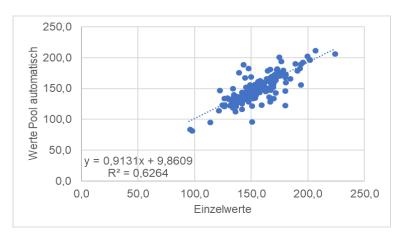


Abbildung 56: Regressionsgerade aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe und den entsprechenden Poolproben, unter Berücksichtigung der Lagerungsdauer

Nahezu identische Ergebnisse kamen ebenso vor, wie Abweichungen von etwa 30 %. Dies betraf zeitgleich gemessene Betriebe genauso wie Betriebe, die erst bis zu neun Monate später gemessen wurden.

Dieser Versuch wurde ebenfalls nach der Etablierung der Methode erneut durchgeführt. Die Messung der Pool- und Einzelproben erfolgte hier zeitgleich. Wie in Tabelle 42 ersichtlich, lag eine sehr hohe Korrelation vor. Der Korrelationskoeffizient war deutlich höher als bei der Durchführung des Versuches vor der Etablierung der Methode.

Tabelle 42: Korrelationskoeffizienten nach Pearson aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe und den entsprechenden Poolproben, nach Etablierung der Methode (n= 21 Betriebe)

Paar	r	р
Einzelwerte/ Betriebe Pool	0,978	p< 0,001

In Abbildung 57 ist die entsprechende Regressionsgerade dargestellt.

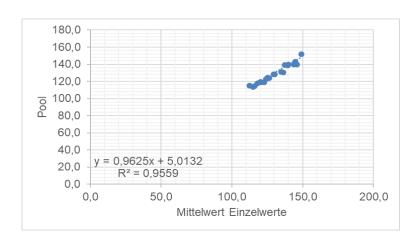


Abbildung 57: Regressionsgerade aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe und den entsprechenden Poolproben, nach Etablierung der Methode

#### 5 Diskussion

#### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Proben

Im Rahmen der Bestandsbetreuung wurden von der Klauentierklinik der FU Berlin routinemäßig Proben für die verschiedenen Untersuchungen gewonnen. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Ceruloplasminbestimmungen wurden Teile der Serum- und Plasmaproben des gesammelten Materials verwendet. Zunächst kamen für die Plasmaproben 2 ml- Lithium- Heparin- Blutgasmonovetten (Monovette 2 ml LH LH 50 I.U./ ml Ca++ balanced Sarstedt AG & Co. D- 51588 Nümbrecht) zum Einsatz. Hierbei traten jedoch massive Probleme bezüglich einer unzureichenden Gerinnungshemmung auf. Sowohl ein wiederholtes Zentrifugieren als auch ein zusätzliches Filtern der Proben brachten keinen ausreichenden Erfolg. Möglicherweise ist das Blut nicht hinreichend mit dem Gerinnungshemmer durchmischt worden. Um die anderen Analysen nicht zu beinträchtigen, war ein Schütteln der Blutgasröhrchen zur besseren Durchmischung nicht zulässig. Deswegen wurden die Proben für die Ceruloplasminbestimmungen schließlich aus einem anderen Röhrchen (Monovette 9 ml LH LH 16 I.U./ ml 92x16 mm Sarstedt AG & Co. D- 51588 Nümbrecht) entnommen. Dieses enthielt ergänzend Perlen zur Vergrößerung der Kontaktoberfläche mit der Probe. Daraufhin verbesserte sich das Problem deutlich. Dennoch traten bei einigen Messungen weiterhin Gerinnsel auf.

#### 5.1.2 Untersuchungsmethode

Um die manuelle Methode auf das Cobas Mira übertragen zu können, mussten einige Punkte berücksichtigt werden. Es wurde überprüft, ob die Messung auch ohne die Verwendung der giftigen Chemikalie Natriumazid durchgeführt werden kann. Da es im Cobas Mira zu einer unverzüglichen Extinktionsmessung kam bzw. die Proben vor der Messung nicht zwischengelagert werden mussten (siehe manuelle Methode: Umfüllen in Küvetten des Photometers zur Extinktionsbestimmung), konnte auf den Einsatz der Chemikalie verzichtet werden.

Nach Sunderman und Nomoto (1970) beeinträchtigt eine Verdünnung der Probe weniger als 31- fach die Ergebnisse, da das in der Probe enthaltene Chlorid einen hemmenden Effekt auf die Reaktion hat (eine geringere Verdünnung entspricht einer höheren Chloridkonzentration). Die in der vorliegenden Arbeit für die automatische Methode verwendete Verdünnung betrug 290/ 20 bzw. 14,5- fach. In einer Studie, in der die Methode nach Sunderman und Nomoto (1970) in modifizierter Form verwendet wurde, kamen deutlich geringere Verdünnungen zum Einsatz, außerdem wurde hier PPD- HCL verwendet, welches zusätzliches Chlorid liefert (Ceron & Martinez-Subiela 2004). Martinez-Subiela et al. (2007) verwendeten in ihrer Methode, welche der hier vorgestellten automatischen Methode ähnelt, eine Verdünnung von 1:10.

Die in der vorliegenden Arbeit diesbezüglich angestellte Untersuchung (siehe Punkt 4.1.3) wies ebenfalls einen hemmenden Effekt von Chlorid nach, welcher mit steigender Chloridkonzentration linear wuchs.

Nach Sunderman und Nomoto (1970) werden über den Farbstoff (PPD) 17,8 und über die Probe 3,2 mmol/ I Chlorid eingetragen. Daraus ergab sich eine Konzentration von 21 mmol/ I Chlorid für die manuelle und 24 mmol/ I Chlorid für die automatische Methode. Somit unterschied sich die Chloridkonzentration beider Methoden nicht wesentlich. Zudem war kein relevanter Einfluss durch den Eintrag von veränderten Chloridkonzentrationen aus Blutproben erkrankter Rinder zu erwarten. Allerdings sollte das Herstellen der Lösungen und Verdünnungen immer mit Aqua dest. anstelle von NaCl- Lösung erfolgen.

#### 5.1.3 Statistik

Für die ANOVA wurde als post- hoc- Test eine Bonferroni- Korrektur durchgeführt, um das α-Level anzupassen. Die Bonferroni- Korrektur begrenzte die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler erster Art zu begehen. Da es ein konservatives Korrekturverfahren ist, erhöhte sich jedoch mit steigender Anzahl durchgeführter Tests die Wahrscheinlichkeit falsch negative Ergebnisse zu erhalten (Bland & Altman 1995).

# 5.2 Zuverlässigkeit der Methode

#### 5.2.1 Kontrollproben

#### 5.2.1.1 Kontrollproben allgemein

Von Beginn an waren einige Auffälligkeiten bei verschiedenen Messungen zu beobachten. Beispielsweise wurden bei Wiederholungsmessungen mal reproduzierbare Resultate erzielt, dann jedoch wieder deutlich abweichende Werte ermittelt. Es kam auch vor, dass unter vielen guten Ergebnissen einige Werte deutlich aus der Reihe fielen.

Außerdem war nicht klar, wie lange die Proben eingefroren gelagert werden können, ohne einen Aktivitätsverlust zu erleiden.

Um einen besseren Eindruck von der Richtigkeit der Werte zu erlangen, wurden die Kontrollmessungen eingeführt. Eine Lagerungsstabilität bei definierten Bedingungen vorausgesetzt, waren bei funktionierender Methode gleichbleibende Kontrollwerte zu erwarten. An diesen konnte dann abgeschätzt werden, ob die gemessenen Konzentrationen, beispielsweise der Bestandsproben, für die weitere Interpretation genutzt werden können.

#### 5.2.1.2 Auffälligkeiten bezüglich der Messungen der Kontrollproben

Die mit der manuellen und automatischen Methode durchgeführten Kontrollmessungen unterschieden sich insbesondere in der Anzahl der gemessenen Kontrollproben pro Durchlauf und deren Position auf dem Reagenzständer.

Pro Durchlauf der manuellen Methode wurde in der Regel eine Doppelbestimmung je Serumbzw. Plasmakontrolle durchgeführt. Die häufigste Auffälligkeit bestand darin, dass ein Wert der Doppelbestimmung stark abwich. Dies wurde sowohl bei den Serum- als auch den Plasmakontrollen beobachtet. Die Gerinnselbildung und damit Bindung des Ceruloplasmins in diesem, war eine mögliche Fehlerquelle. Zudem waren verschiedene weitere Fehlerquellen denkbar. Diese konnten beispielsweise Pipettierfehler sein. Ein gewisses Fehlerpotential ergab sich aus der langen Zeitdauer, die nötig war, um alle Flüssigkeiten zu pipettieren. Der Durchsatz der manuellen Methode war sehr begrenzt, insbesondere da für jeden Wert Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Um die große Probenzahl bewältigen zu können, wurden die Reagenzständer mit vielen Probenröhrchen beladen. Dies erhöhte einerseits den Durchsatz, andererseits erschwerte dieses Vorgehen die Handhabung deutlich. Besonders

kritisch war der Schwenkvorgang des Reagenzständers zum Mischen der Proben zu sehen. Dabei bestand die Gefahr, dass einige Röhrchen nicht ganz dicht verschlossen sind und auslaufen oder Flüssigkeit aus anderen Proben eindringt. Gelangte beispielsweise mit Natriumazid vermischte Flüssigkeit aus R1 in R2, waren die potenziellen Auswirkungen besonders gravierend, da die enzymatische Reaktion vermindert oder gar gestoppt würde.

Auch bei der automatischen Methode wurden Doppelbestimmungen der Kontrollproben durchgeführt. Pro Durchlauf konnten mit der automatisierten Methode deutlich mehr Proben bestimmt werden, sodass auch die Anzahl der Kontrollproben erhöht wurde. Diese befanden sich, je nach Anzahl der zu bestimmenden Proben, in der Regel am Anfang, in der Mitte und am Ende der Messreihe. Die Auffälligkeiten bei den Kontrollen der automatischen Messungen ließen mehr Spielraum für Interpretationen. So kam es vor, dass bei sechs bestimmten Serumkontrollen fünf Werte sehr eng beieinander lagen, während ein Wert stark nach oben oder unten abwich. Abweichungen nach unten könnten auf eine mögliche Gerinnselbildung zurückgeführt werden. Diese würden Ceruloplasmin binden, womit es nicht mehr für die Reaktion zur Verfügung steht. Beobachtet wurde jedoch auch, dass sich nach der Reaktion in einigen Küvetten des Messgerätes deutlich geringere Reaktionsmengen befanden. Denkbar wäre hier, dass ein mögliches Gerinnsel die Ansaugvorrichtung des Gerätes verstopft hat und somit nicht ausreichend Reaktionsmaterial angesaugt werden konnte. Da dies jedoch erst festgestellt werden konnte, wenn das Gerät die verbrauchten Küvetten auswirft, konnte die weniger befüllte Küvette nicht sicher mit der abweichenden Probe in Verbindung gebracht werden. Bei einigen Messungen waren während des Durchlaufs steigende, bei anderen Durchläufen fallende Kontrollwerte beobachtet worden. Dies trat bei den Serum- und Plasmakontrollen gleichzeitig auf. Ein Fall mit konstanten Serum- bei steigenden Plasmakontrollen wurde ebenfalls beobachtet. Für die fallenden Kontrollwerte kann theoretisch eine zu alte PPD- Lösung die Ursache sein. Nach Sunderman und Nomoto (1970) sollte diese nicht verwendet werden, wenn sie älter als drei Stunden ist. In den beobachteten Fällen war die PPD- Lösung jedoch auch am Ende der Reaktion nicht älter als drei Stunden. Weiterhin wäre auch eine zu niedrige Reaktionstemperatur denkbar. Bei den Durchläufen mit den steigenden Kontrollen stiegen auch die übrigen Messwerte an. Dieses Phänomen wurde bei mehreren aufeinanderfolgenden Durchgängen beobachtet. Für steigende Konzentrationen könnte beispielsweise eine ansteigende Temperatur ursächlich sein. Sie müsste dann jedoch innerhalb eines Durchlaufes ansteigen und dies erneut bei den folgenden Messungen. Somit erschien auch diese mögliche Ursache recht unwahrscheinlich. Eine Erklärung für die Erhöhung bei den Proben, bei denen nur die Plasmawerte angestiegen waren, konnte mit diesen Überlegungen nicht gegeben werden. Abschließend war der Grund nicht zu identifizieren. Auch kam es vor, dass bei Mehrfachbestimmungen nur ein oder zwei Werte deutlich nach oben abwichen. Für Konzentrationsabweichungen nach unten erschienen mögliche Gerinnsel als wahrscheinlichste Ursache in Frage zu kommen. Gründe für Abweichungen nach oben könnten beispielsweise Pipettierfehler sein. Sollte das Messgerät unverhältnismäßig viel Probe oder PPD- Lösung bzw. zu wenig Pufferlösung ansaugen, wären erhöhte Konzentrationen möglich. Es wurde nicht beobachtet, dass sich das PPD schlecht in der Pufferlösung verteilt oder auflöst. Sollte dennoch ein größerer Partikel in eine Reagenzküvette überführt werden, könnte er zu einer erhöhten Extinktion und schließlich auch einer falsch- hohen Ceruloplasminkonzentration führen. All diese Überlegungen sind eher hypothetischer Natur.

Die nachfolgenden Tabellen 43 bis 46 veranschaulichen die oben genannten Beispiele.

Tabelle 43: Beispiele für im Durchlauf ansteigende Cp- Konzentrationen der Kontrollwerte (in mg/ I), Serum- und Plasmawerte wurden parallel bestimmt; automatische Messung

Bsp.	S	MW_S	Р	MW_P	Bsp.	S	MW_S	Р	MW_P
1	111	118,6	164	191,6	2	112	119,8	164	195,6
1	108		164		2	112		163	
1	119		202		2	120		208	
1	122		201		2	122		206	
1	125		208		2	126		214	
1	127		211		2	127		220	

Bsp.: Beispiel

S: Cp- Konzentration der Serumprobe; MW\_S: Mittelwert aus den Serumproben

P: Cp- Konzentration der Plasmaprobe; MW\_P: Mittelwert aus den Plasmaproben

Tabelle 44: Beispiel für in den Serumproben stabile und den parallel gemessenen Plasmaproben steigende Cp- Konzentrationen der Kontrollen (in mg/ l); automatische Messung

Bsp.	S	MW_S	Р	MW_P
1	97	93,8	141	153,6
1	93		141	
1	93		166	
1	93		166	

Bsp.: Beispiel

S: Cp- Konzentration der Serumprobe; MW\_S: Mittelwert aus den Serumproben

P: Cp- Konzentration der Plasmaprobe; MW\_P: Mittelwert aus den Plasmaproben

Tabelle 45: Beispiel für im Durchlauf fallende Cp- Konzentrationen der Kontrollwerte (in mg/ I), Serum- und Plasmawerte wurden parallel bestimmt; automatische Messung

Bsp.	S	MW_S	Р	MW_P
1	101	91,9	142	135,1
1	100		147	
1	97		145	
1	97		144	
1	79		120	
1	78		113	

Bsp.: Beispiel

S: Cp- Konzentration der Serumprobe; MW\_S: Mittelwert aus den Serumproben

P: Cp- Konzentration der Plasmaprobe; MW\_P: Mittelwert aus den Plasmaproben

Tabelle 46: Beispiele für deutliche Ausreißer der ermittelten Cp- Konzentrationen in den Kontrollwerten (in mg/ I), Serum- und Plasmawerte wurden parallel bestimmt; automatische Messung

Bsp.	S	MW_S	Р	MW_P	Bsp.	S	MW_S	Р	MW_P
1	102	114,8	149	148,7	3	104	112,9	161	148,9
1	99		149		3	103		157	
1	100		149		3	104		157	
1	98		150		3	103		156	
1	100		148		3	104		102	
1	101		147		3	160		160	
1	99		150		4	99	98,8	148	150,0
1	220		148		4	101		148	
2	105	92,5	154		4	98		147	
2	106		158		4	99		147	
2	103		152		4	99		144	
2	56		156		4	98		165	

Bsp.: Beispiel

S: Cp- Konzentration der Serumprobe; MW\_S: Mittelwert aus den Serumproben

P: Cp- Konzentration der Plasmaprobe; MW\_P: Mittelwert aus den Plasmaproben

#### 5.2.2 Messgenauigkeit

#### Präzision in der Serie und von Tag zu Tag

Sunderman und Nomoto (1970) haben für ihre Methode die Messgenauigkeit bei Serumproben untersucht. Für die Präzision in der Serie wurde ein Variationskoeffizient von 1,25 % angegeben. Die Messgenauigkeit von Tag zu Tag über einen Zeitraum von vier Wochen betrug 2,8 %. Eine weitere Untersuchung lieferte intraday- Variationskoeffizienten zwischen 5,2 und 8,1 % bzw. interday- Variationskoeffizienten von 8,1 und 9,6 % (Ceron & Martinez-Subiela 2004). Für die Methode nach Martinez-Subiela et al. (2007) wurden für die Präzision in der Serie Variationskoeffizienten von 1,12 bzw. 1,32 % ermittelt. Die Genauigkeit von Tag zu Tag war mit Koeffizienten von 8,44 bzw. 9,71 % deutlich geringer (Martinez-Subiela et al. 2007). Die beiden letztgenannten Methoden dienten der automatischen Cerluoplasminbestimmung beim Hund bzw. Schwein. Eine aktuelle Untersuchung zur manuellen Ceruloplasminbestimmung lieferte für die hier vorgestellte Methode intraday-Variationskoeffizienten von 0,91 bzw. 1,25 % für Plasmaproben (Hussein & Staufenbiel 2017). Für Messungen über zehn Tage betrugen die Variationskoeffizienten 1,87 bzw. 2,37 % (Hussein & Staufenbiel 2017).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 47 zusammengefasst.

Zur Interpretation des Variationskoeffizienten war die tatsächliche Ceruloplasminkonzentration im Zeitverlauf zu berücksichtigen. Erwartete man stabile Konzentrationen im Zeitverlauf, ist der Variationskoeffizient anders zu bewerten als bei ansteigenden oder abfallenden Werten. Eine exakte Messung angenommen, musste der Variationskoeffizient bei steigenden oder fallenden Werten immer größer sein als bei einer genauen Messung eines konstanten Wertes.

Tabelle 47: intra- und interday- Variationskoeffizienten verschiedener Autoren

Ме	dium	VK <sup>intra</sup>	MW± SD		VK <sup>inter</sup>	MW± SD
(Sun	derman	& Nomoto	1970)			
	S	0,0125	0,335± 0,0042 g/ l		0,028a	0,341± 0,0097 g/ l
(Cer	on & Ma	rtinez-Subi	iela 2004)			
	S	0,081	0,0016± 0,00013 abs/ min		0,096 <sup>b</sup>	0,0027± 0,00026 abs/ min
	S	0,052	0,030± 0,0013 al	bs/ min	0,081 <sup>b</sup>	0,028± 0,0023 abs/ min
(Mar	tinez-Su	biela et al.	2007)			
	S	0,0112	0,034± 0,0002 al	bs/ min	0,0971°	0,040± 0,0039 abs/ min
	S	0,0132	0,025± 0,0001 al	bs/ min	0,0844°	0,072± 0,0061 abs/ min
(Hus	sein & S	Staufenbiel	2017)			
	Р	0,0125	233± 2,9 mg/ l		0,0237 <sup>d</sup>	228± 5,4 mg/ l
	Р	0,0091	276± 2,5 mg	276± 2,5 mg/ l		275± 5,2 mg/ l
Hier,	Werte k	pestimmt m	it der manuellen M	ethode		
S <sup>1</sup>	0,0124	- 0,0150	190± 2,4 - 220± 3,3 mg/ l		0,0526	142± 7,7 mg/ l
$P^1$	0,0200 - 0,0315		237± 4,7 - 225± 7,1 mg/ l		0,0466	217± 10,1 mg/ l
Hier,	Werte b	oestimmt m	it der automatische	n Method	le	
S <sup>2</sup>	0,0100	0 - 0,0237	74± 0,7 - 74± 1,8 mg/ l		0,0384	106± 4,1 mg/ l
$P^2$	0,0106	6 - 0,0107	97± 1,0 - 97± 1,0 mg/ l		0,0431	158± 6,8 mg/ l
Hier,	Werte b	oestimmt a	us dem Lagerungsv	ersuch K	ühlschrank	x, automatische Methode
S				0,02	88 <sup>MW</sup>	143± 3,3 - 193± 8,9 mg/ l
Р				0,02	13 <sup>MW</sup>	147± 2,3 - 181± 5,0 mg/ l
Hier,	Werte b	pestimmt na	ach Etablierung der	automati	schen Met	hode
S <sup>3e</sup>				0,0857	- 0,0873	90± 7,7 - 89± 7,7 mg/ l
P <sup>3e</sup>				0,081 - 0,0850 114± 9,4		114± 9,4 - 166± 9,9 mg/l

 $VK^{intra}$ : intraday- Variationskoeffizient;  $VK^{inter}$ : interday- Variationskoeffizient  $^{1}$ n= 10;  $^{2}$ n= 17;  $^{3}$ n= 10,

#### **Manuelle Messung**

Die in der vorliegenden Arbeit für die Präzision in der Serie ermittelten Variationskoeffizienten der Serumproben (0,012-0,015) lagen in einem Bereich wie auch von Sunderman und Nomoto (1970) ermittelt. Verglichen mit der Studie von Hussein und Staufenbiel (2017) waren die hier ermittelten Variationskoeffizienten der Plasmawerte (0,020 - 0,032) etwas höher.

<sup>&</sup>lt;sup>a</sup> über vier Wochen; <sup>b</sup> über sechs Tage; <sup>c</sup> über fünf Tage; <sup>d</sup> über zehn Tage; <sup>e</sup> über 13 Monate <sup>MW</sup> Mittelwert aus den Variationskoeffizienten der 10 Messungen bei Kühlschranktemperatur abs/ min: Änderung der Absorption/ min

Auch die für die Präzision von Tag zu Tag ermittelten Koeffizienten lagen etwa doppelt bis dreimal so hoch wie die in den anderen Untersuchungen mit der manuellen Methode bestimmten Werte. Allerdings waren die betrachteten Zeiträume in der vorliegenden Arbeit deutlich länger und die Koeffizienten abhängig vom betrachteten Zeitraum sehr unterschiedlich (hier S/P: 17.02.-19.10:: 0,053/0,047; 17.02.-05.05:: 0,014/0,024; 13.07.-19.10:: 0,078/0,66).

#### **Automatische Messung**

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten intraday- Variationskoeffizienten lagen für die Serumproben zwischen 0,010 und 0,024 bzw. 0,011 für die Plasmaproben. Somit waren die Koeffizienten der Plasmaproben geringer als bei der manuellen Methode. Die Variationskoeffizienten lagen etwa im Bereich der von Sunderman und Nomoto (1970), Martinez- Subiela et al. (2007) und Hussein und Staufenbiel (2017) angegebenen Werte, jedoch deutlich unter denen von Ceron und Martinez- Subiela (2004).

Die in dieser Arbeit ermittelten Variationskoeffizienten für die Präzision von Tag zu Tag unterschieden sich deutlich, abhängig von der durchgeführten Untersuchung und dem betrachteten Zeitraum. Die niedrigsten Koeffizienten konnten über den Lagerungsversuch bei Kühlschranktemperatur ermittelt werden. Für die Serumproben betrug die durchschnittliche Genauigkeit 0,029 und 0,021 für die Plasmaproben. Die aus den Kontrollproben gewonnenen Werte betrugen 0,038 bzw. 0,047. Nach der Etablierung der Methode konnten Koeffizienten unter 0,088 bzw. 0,086 erzielt werden. Die Variationskoeffizienten des Lagerungsversuches wurden über 12 Tage, also einen sehr viel kürzeren Zeitraum als bei den anderen hier durchgeführten Untersuchungen (ca. 1 Jahr) ermittelt. Da die Ceruloplasminkonzentration im Zeitverlauf abnahm, hatte der Bestimmungszeitraum mit zunehmender Länge einen negativen (Variationskoeffizienten steigen unter sonst gleichen Umständen) Einfluss auf den Variationskoeffizienten. Dies war auch im Vergleich mit den Werten der anderen hier genannten Studien zu berücksichtigen, da die dort untersuchten Zeiträume ebenfalls deutlich geringer waren. Dennoch lagen die ermittelten Variationskoeffizienten im Bereich der anderen Studien zu den automatisierten Methoden bei Hund und Schwein (Ceron & Martinez-Subiela 2004; Martinez-Subiela et al. 2007) oder deutlich darunter (Sunderman & Nomoto 1970; Hussein & Staufenbiel 2017).

Nach Ceron und Martinez-Subiela (2004) ist ein Variationskoeffizient unter 10 für ihre automatisierte Methode zur Ceruloplasminmessung ein gutes Ergebnis.

#### 5.3 Lagerungsversuch

#### 5.3.1 Allgemeines

Zur Stabilität des Ceruloplasmins unter verschiedenen Lagerungsbedingungen gab es nur wenige Daten. In dieser Untersuchung waren die Konzentrationsverläufe unter den unterschiedlichen Aufbewahrungsbedingungen teilweise recht variabel. Beispielsweise folgten auf fallende Konzentrationen wieder ansteigende Werte, gefolgt von letztlich erneut fallenden Konzentrationen. Auch in anderen Studien gab es gewisse Abweichungen nach oben oder unten. Schwankungen, die kleiner als der Variationskoeffizient der Untersuchungsmethode waren, können als nicht klinisch relevant betrachtet werden (Mathew et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit waren die Variationskoeffizienten für die Präzision von Tag zu Tag vom betrachteten Zeitraum abhängig. Sie lagen für die Serummessungen zwischen 0,029 und 0,087 bzw. 0,021 und 0,085 für die Messungen im Plasma. Zumindest für die höheren Koeffizienten würde dies eine gravierend andere Einschätzung bedeuten, da ein Großteil der Werte im Schwankungsintervall läge und die Verläufe somit als konstant interpretiert werden könnten.

Unter bestimmten Bedingungen kann es notwendig sein, Proben zu verschiedenen Zeitpunkten messen zu müssen (Cray et al. 2009). Dazu zählen beispielsweise logistische Gegebenheiten wie der Probennahmezeitpunkt (Cray et al. 2009) oder Transportwege sowie die individuellen Analysemöglichkeiten verschiedener Labore (Martins et al. 2017). Insbesondere für die Ceruloplasminbestimmung in Rinderblutproben müssen diese häufig erst an ein Labor versendet werden (Martins et al. 2017). Auch die begrenzte Zahl an Analysen, die an einem Tag erfolgen können, kann die Lagerung von Proben notwendig werden lassen (Martins et al. 2017). Außerdem werden Proben gelagert, um bereits erhobene Ergebnisse validieren zu können (Hussein & Staufenbiel 2017). Verzögerungen beim Versand, Stromausfälle und Abtauzyklen von Gefriergeräten können sich auf die Proben auswirken (Cuhadar et al. 2013). Nach Simundic und Lippi (2012) ist die präanalytische Phase der wichtigste und anfälligste Teil des gesamten Analyseprozesses. 60- 70 % der in der Labordiagnostik auftretenden Fehler sind auf die präanalytische Phase zurückzuführen (Lippi et al. 2011). Darunter zählt auch die Phase der Probenlagerung. Bei der Auswertung des Lagerungsversuches erschien daher zudem die Berücksichtigung der Messzeitpunkte diskutabel. In der vorliegenden Arbeit wurden die Proben erstmalig einige Stunden nach der Probennahme gemessen. Unter praktischen Bedingungen kann es durch die oben genannten Punkte jedoch zu einer deutlichen Verzögerung der ersten Messung kommen. Denkbar wäre

deswegen beispielsweise auch die Messergebnisse des ersten Messtages und nicht die des Probennahmetages als Ausgangspunkt anzusehen.

#### 5.3.2 Lagerung der Proben bei Raumtemperatur (bei 20°C)

#### Serumproben

Klammerte man den Wert des ersten Messtages aus, ergab sich ein durchweg fallendes Bild der Konzentrationen. Die Konzentrationen des Messtages 0 waren jedoch nur signifikant größer als die der Messtage 1, 5, 6 sowie 12 und 14. Zu den Messtagen 2, 3, 4 und 7 gab es also keinen signifikanten Unterschied. Zwischen den Werten der Messtage 2 bis 7 gab es ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Von Messtag 1 auf Messtag 2 kam es zu einem Anstieg der Ceruloplasminkonzentration. Ausgehend vom Probennahmetag ergaben sich bereits nach 24 Stunden signifikant unterschiedliche Konzentrationen. Einige der folgenden Tage unterschieden sich wiederum nicht signifikant von diesem. Ab dem zweiten bis zum siebten Tag nach der Probennahme konnten Serumproben ohne signifikanten Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Spätestens nach 12 Tagen Lagerung der Proben bei Raumtemperatur war von einem signifikanten Abfall der Werte auszugehen. Nun war jedoch zwischen Messtag 0 und Messtag 7 kein signifikanter Unterschied festzustellen. Bezog man die oben angestellten Überlegungen zum Variationskoeffizienten mit ein, befanden sich die Werte der Messtage 1 bis 7 im unteren Schwankungsbereich (0,021) der Messgenauigkeit der Methode. Der obere Schwankungsbereich (0,085) würde auch Messtag 0 einschließen. Demnach konnten die Serumproben auch von Messtag 1 bzw. 2 bis 7 stabil gelagert werden. Dies war auch das Ergebnis, würde man Messtag 1 als Ausgangspunkt festlegen.

#### **Plasmaproben**

Die Ceruloplasminkonzentrationen vom Tag der Probennahme und dem ersten Messtag unterschieden sich nicht signifikant von denen der anderen Messtage. Die Messtage 2 bis 7 unterschieden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander, allerdings lagen ihre Konzentrationen signifikant über denen der Messtage 12 und 14. Letztere unterschieden sich wiederum nicht signifikant voneinander.

Wenn auch statistisch korrekt, erschien es logisch nicht schlüssig, dass sich die Werte der Messtage 0 und 1 nicht von den übrigen Werten unterschieden, während die Konzentrationen der Messtage 2 bis 7 signifikant über denen der letzten beiden Tage lagen. Insbesondere nicht,

da die Werte der Messtage 0 und 1 zwischen denen der Tage 2 bis 7 lagen. Auch wenn es keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den beiden Messtagen 0 und 1 und den übrigen Messtagen gab, kann von einer stabilen Lagerung der Plasmaproben nur über die Messtage 2 bis 7 ausgegangen werden. Spätestens ab dem zwölften Tag war mit einem Aktivitätsverlust zu rechnen. Da es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Konzentrationen des Messtages 0 und den anderen Messtagen gab, ist auch eine Interpretation derart möglich, dass eine stabile Lagerung der Plasmaproben bis zum Messtag 14 möglich war. Diese Interpretation war ebenfalls unbefriedigend, da die Werte der Messtage 12 und 14 deutlich unter den Vorherigen lagen. Insbesondere die Konzentration von Messtag 14 war auch unter Einbeziehung des Variationskoeffizienten nicht mit den anderen Werten in Einklang zu bringen. Gegen eine solch lange stabile Lagerungsmöglichkeit spricht auch die Beobachtung aus einer anderen Studie, in der Plasmaproben nur über drei Tage ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert werden konnten (Hussein & Staufenbiel 2017).

#### 5.3.3 Lagerung der Proben im Kühlschrank (bei 8°C)

#### Serumproben

Hier ergab sich ein wellenförmiger Verlauf mit schließlich fallender Tendenz. Die Ceruloplasminkonzentration an Messtag 5 war beispielsweise kleiner als die anderen Konzentrationen, ausgenommen die der letzten beiden Messtage. Eine mögliche Interpretation war die eines stabilen Verlaufes bis zum vierten Messtag. Da sich nur der Wert des Messtages 12 signifikant von der Konzentration am Probennahmetag unterschied, war auch eine mögliche stabile Lagerung über einen längeren Zeitraum denkbar. Dieser umfasste mindestens Messtag 7. Auch Messtag 14 unterschied sich nicht signifikant vom Probennahmetag. Jedoch konnte die niedrige Konzentration des Messtages 12 auch über die Ungenauigkeit der Messung nicht mit den anderen Werten zusammengebracht werden. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Verwendung von Messtag 1 als Ausgangswert.

#### **Plasmaproben**

Es war ebenfalls ein wellenförmiger Verlauf in einer gewissen Spannbreite auszumachen, bevor die Konzentrationen deutlich abfielen. Auch hier waren unterschiedliche Interpretationen denkbar. Es unterschied sich ausschließlich Messtag 6 signifikant vom Probennahmetag. Daher konnte grundsätzlich von einem stabilen Konzentrationsverlauf bis einschließlich

Messtag 5 ausgegangen werden. Denkbar war auch den Bereich bis zum Messtag 14 auszudehnen, allerdings konnte keine Erklärung für die Abweichung an Messtag 6 gegeben werden. Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Verwendung von Messtag 1 als Ausgangswert. Gegen eine solch lange stabile Lagerungsmöglichkeit sprach auch die Beobachtung aus einer anderen Studie, in der Plasmaproben nur über drei Tage ohne signifikanten Aktivitätsverlust gelagert werden konnten (Hussein & Staufenbiel 2017). Werden Proben zunächst für 24 Stunden bei 4°C gelagert und wird erst anschließend das Plasma gewonnen, war auch kein Aktivitätsverlust festzustellen, wenn diese danach auch noch für weitere 24 Stunden eingefroren und anschließend gemessen werden (Martins et al. 2017).

#### 5.3.4 Lagerung der Proben im Tiefkühler (bei -20°C)

Grundsätzlich waren auch die Kontrollmessungen von verschiedenen Ausreißern betroffen. Für die hier dargestellten Überlegungen wurden die nach der Datenaufbereitung (siehe Punkte 3.8.1.2 und 3.8.1.3) verbliebenen Werte verwendet.

Dass es nach einer gewissen Zeit zu Aktivitätsverlusten kommt, war bekannt und auch in dieser Untersuchung zu beobachten. Jedoch wurden hier für alle Lagerungsbedingungen teilweise recht variable Konzentrationsverläufe beobachtet. Darunter fielen auch Aktivitätssteigerungen des Ceruloplasmins. Dennoch erschien eine Zunahme der Ceruloplasminaktivität unwahrscheinlich. Nachvollziehbare Ursachen für eine Aktivitätssteigerung von Ceruloplasmin durch Tiefgefrieren oder andere hier beschriebene Lagerungsarten waren nicht bekannt. Allerdings berichteten Jansen et al. (2013), dass es bei einer Ceruloplasminlagerung bei -20°C nach neun Monaten einmalig zu einer signifikanten Aktivitätssteigerung gekommen ist. Diese Steigerung betrug 6 %, bezogen auf den Ausgangswert und wurde in Serumproben ermittelt (Jansen et al. 2013). Eine Ursache für die Erhöhung wurde nicht angegeben. Nach Jansen et al. (2013) konnten humane Ceruloplasminserumproben bei -20°C für fast ein Jahr stabil gelagert werden. Die nach 12 Monaten gemessenen Werte lagen 5 % unter dem Ausgangswert. Unter Berücksichtigung eines Kontrollwertes konnte jedoch von einem stabilen Verlauf über 12 Monate ausgegangen werden (Jansen et al. 2013). In einem anderen Versuch wurde Ceruloplasmin über 12 Monate stabil bei -80°C gelagert (Mathew et al. 2009). Nach Hussein und Staufenbiel (2017) konnten Ceruloplasminplasmaproben tiefgefroren über mindestens drei Monate ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden.

Bei der Betrachtung eines Jahreszeitraumes mit Hilfe der Regressionsgeraden ergaben sich die in Tabelle 48 ersichtlichen prozentualen Verluste der Ceruloplasminkonzentrationen.

Tabelle 48: prozentualer Verlust an Ceruloplasmin im Jahresverlauf

Medium	Zeitraum	Verlust in %
Serumkontrolle_a	17.02.2015 – 17.02.2016	13
Plasmakontrolle_a	17.02.2015 – 17.02.2016	10
Serumkontrolle_a nach Etablierung	13.07.2016 – 13.07.2017	14
Plasmakontrolle_a nach Etablierung	13.07.2016 – 13.07.2017	10

\_a: Werte aus der automatischen Messung

Demnach sank die Konzentration der Ceruloplasminproben bei Tiefkühllagerung innerhalb eines Jahres um ca. 10- 14 %. Dabei ist der Verlust in den Serumproben etwas höher als in den Plasmaproben.

#### 5.3.5 Lagerung der Proben mit Einfrier- Auftauzyklus (bei -20°C)

#### Serumproben

Für die Serumproben konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Proben festgestellt werden. Daraus ließ sich schlussfolgern, dass viermaliges Einfrieren und Auftauen keinen Einfluss auf die Ceruloplasminkonzentration hat.

#### **Plasmakontrollen**

Einmaliges Einfrieren und Auftauen einer Plasmaprobe erzeugte keinen Unterschied in der Ceruloplasminkonzentration zum Probennahmetag. Zweimaliges Einfrieren und Auftauen führte jedoch zu einer Konzentrationssteigerung. Bei häufigerer Durchführung nahm die Konzentration dagegen wieder ab. Ein Trend war daraus nicht abzuleiten.

Es war kein Grund bekannt, weswegen die Ceruloplasminkonzentration durch diese Prozedur ansteigen sollte. Daher ist es denkbar, dass auch die Konzentrationen der Plasmaproben nicht wesentlich durch diesen Zyklus beeinflusst wurden.

In einer anderen Studie war nach einem dreimaligen Einfrier- Auftauzyklus kein signifikanter Aktivitätsverlust beobachtet worden (Hussein & Staufenbiel 2017). Nach Martins et al.(2017) waren die Werte nach dem dritten Zyklus etwas niedriger.

#### 5.3.6 Vergleich der Lagerung der Proben bei Raumtemperatur und im Kühlschrank

Die im Kühlschrank gelagerten Proben wiesen zu jedem Zeitpunkt eine höhere Ceruloplasminaktivität auf als die entsprechenden bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Dieser Unterschied war nicht signifikant. In einer anderen Studie waren diese Unterschiede jedoch teilweise statistisch signifikant (Hussein & Staufenbiel 2017).

### 5.4 Auswertung der Betriebe

Für diese Untersuchung wurden ausschließlich Daten der Betriebe verwendet, die sowohl mit der manuellen als auch der automatischen Methode ermittelt wurden. Dadurch sollte eine bessere Vergleichbarkeit ermöglicht werden.

Grundsätzlich waren die Ergebnisse für beide Messmethoden und über beide Probenarten ähnlich. Vor der Kalbung hatten die Rinder die niedrigsten Ceruloplasminkonzentrationen. Anschließend stiegen die Konzentrationen auf ein Maximum in Laktationsgruppe 2. Schließlich fielen die Werte wieder ab.

Eine Studie, welche die gleichen Laktationszeiträume untersuchte, führte zu ähnlichen Ergebnissen. Sowohl in Serum- als auch Plasmaproben waren die Konzentrationen vor der Kalbung am niedrigsten, jedoch nicht statistisch signifikant (Hussein 2012). Die höchsten Ceruloplasminkonzentrationen waren ebenfalls in der zweiten Laktationsgruppe zu finden, wobei dieses Ergebnis nur in den Plasmaproben signifikant war (Hussein 2012). Von Gruppe 2 über Gruppe 3 auf Gruppe 4 fielen die Konzentrationen wieder ab (Hussein 2012).

Erhöhte Konzentrationen von Akute- Phase- Proteinen können im postpartalen Zeitraum infolge einer physiologischen Akute- Phase- Reaktion im Zusammenhang mit der Geburt auftreten. Hussein (2012) beobachtete die höchsten Ceruloplasminkonzentrationen im Zeitraum nach der Abkalbung. In einer weiteren Studie wurden erhöhte Konzentrationen verschiedener APPs nach der Kalbung gemessen und mit physiologischen Umbauprozessen während der Geburt assoziiert (Koets et al. 1998).

## 5.5 Methodenvergleich

# 5.5.1 Bestimmung des Pearson- Korrelationskoeffizienten zum Vergleich der manuellen und automatischen Methode

Die in dieser Arbeit verglichenen Methoden dienten beide der Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration und somit demselben Zweck. Dass die Ergebnisse der Messungen in einer gewissen Beziehung standen, ist daher naheliegend und wurde durch die ermittelten hohen Korrelationskoeffizienten bestätig. Die unter 4.4.2 ermittelten Faktoren ließen sich auch aus den Regressionsgeraden der Diagramme unter Punkt 4.4.1 ableiten. Die Korrelation untersucht jedoch nur die Beziehung zwischen einer Variablen und einer anderen und nicht deren Unterschiede (Giavarina 2015). Deswegen wird die Analyse der Korrelation nicht als Methode zur Beurteilung der Vergleichbarkeit zwischen zwei Messverfahren empfohlen (Giavarina 2015). Um auch Unterschiede zwischen den Methoden zu berücksichtigen, ist ein Bland- Altman- Plot geeignet (Giavarina 2015).

#### 5.5.2 Korrekturfaktor

Grundsätzlich sollte die automatische Methode alternativ zur manuellen Messung verwendet werden können. Da sich beide Methoden voneinander unterscheiden, konnten die Werte nicht eins zu eins übertragen werden. Die über die automatische Methode ermittelten Ceruloplasminkonzentrationen waren niedriger als die mit der manuellen Methode gemessenen Werte. Über einen Korrekturfaktor konnten die Werte beider Methoden in Relation gesetzt werden. Zum einen erleichterte dieses Vorgehen den Vergleich der Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen. Vor allem aber sollte die automatische Methode zukünftig alternativ zur manuellen Untersuchung angewendet werden können. Durch eine Umrechnung können dann beispielsweise auch bestehende Referenzwerte genutzt werden.

Der unter Punkt 3.5.2 ermittelte theoretische Korrekturfaktor betrug 1,74. Aus den Kontrollund Betriebswerten ließen sich für die Serum- und Plasmaproben die Faktoren 1,33 bzw. 1,38 und 1,30 bzw. 1,35 errechnen. Diese unterschieden sich nur geringfügig voneinander, jedoch deutlich vom ermittelten theoretischen Korrekturfaktor. Die Faktoren von 1,30 bzw. 1,35 der Diskussion

Betriebsmessungen wurden als belastbarer angesehen, da sie aus einem breiteren Wertespektrum ermittelt wurden.

Demnach waren die ermittelten automatischen Konzentrationen höher, als theoretisch erwartet.

Dieser Umstand kann durch eine Anpassung der Berechnungsgleichung berücksichtigt werden:

Serum: Cp (mg/l)= 752\* (Extinktion R2- Extinktion R1) \* 1,30

Plasma: Cp (mg/l)= 752\* (Extinktion R2- Extinktion R1) \* 1,35.

Die Extinktionen wurden bei der manuellen Methode bei einer Wellenlänge von 534 und bei der automatischen Methode bei einer Wellenlänge von 550 nm gemessen. Dieser Unterschied wurde bei der Ermittlung des Korrekturfaktors nicht berücksichtigt, da bovines Ceruloplasmin zur Erstellung von Absorptionskurven am Markt nicht verfügbar war. Die fehlende Berücksichtigung der verschiedenen Wellenlängen kann ein möglicher Grund für die Unterschiede zwischen dem theoretischen Faktor und den tatsächlich ermittelten Faktoren sein.

#### 5.5.3 Bland- Altman- Analyse

Bei den mit dem Korrekturfaktor angeglichenen Kontrollwerten unterschieden sich die Differenzen nicht signifikant von null. Außerdem lag die Nulllinie der Mittelwerte innerhalb des 95 %- Konfidenzintervalls der Mittelwerte der Differenzen der Kontrollen. Es ist davon auszugehen, dass beide Methoden die gleichen Ergebnisse lieferten. Zudem waren die Differenzen in absoluten Zahlen, bezogen auf die zugrunde gelegten Konzentrationen, sehr gering. Allerdings stellten die Kontrollwerte keine ideale Datenmenge dar, um diese beiden Methoden zu vergleichen. Besser geeignet wäre ein Datensatz, der Werte in dem zu erwartenden Rahmen enthält, die Daten also nicht um einen eng begrenzten Bereich schwanken. Etwas vermindert wurde dieses Problem durch die gemeinsame Auswertung der Serum- und Plasmakontrollen. Dadurch wurde ein breiterer Bereich abgedeckt. Besser zum Methodenvergleich waren die Werte der Bestandsmessungen geeignet. Diese deckten einen Bereich von etwa 100 bis 300 mg/ l ab.

Nach der Bland- Altman- Analyse lieferte die automatische mit der manuellen Methode übereinstimmende Ergebnisse der Betriebsmessungen. Die Mittelwerte der Differenzen unterschieden sich auch bei den Betriebswerten nicht signifikant von null. Zudem lagen die Nulllinien der Differenzen innerhalb des 95 %- Konfidenzintervalls der Mittelwerte der Differenzen. Dass die Differenzen zufällig über den Wertebereich verteilt waren, ist ebenfalls positiv für die Anwendung der automatischen Methode zu werten. Allerdings musste dies unter Berücksichtigung des Einsatzes der Korrekturfaktoren interpretiert werden. Zu berücksichtigen war ebenfalls, dass für die Mittelwerte der Differenzen der Betriebsmessungen keine Normalverteilung vorlag.

Eine separate Betrachtung der einzelnen Laktationsgruppen führte zu derselben Schlussfolgerung. Allerdings lag hier in den meisten Fällen eine Normalverteilung der Werte vor. Tabelle 49 zeigt eine Übersicht über die Ergebnisse inklusive der Auswertung der Laktationsgruppen.

Tabelle 49: Wichtige Größen der Bland- Altman- Analyse der Betriebswerte (Analyse über die Werte aller Betriebe und separat nach Laktationsgruppen) (Mittelwerte der Differenzen in mg/ I)

Gruppe	n	MW± SD	t-Test p	NV	95 % KI	b	p_b
B_Sges	155	0,3± 9,79	0,745	-	-1,3 – 1,8	0,061	0,064
B_Pges	153	-0,4± 14,86	0,741	-	-2,8 - 2,0	0,052	0,233
S_L1	41	-2,6± 9,83	0,094	+	-5,7 - 0,5	-0,007	0,913
P_L1	41	-2,1± 14,60	0,351	-	-6,8 - 2,5	0,089	0,303
S_L2	43	1,0± 10,12	0,535	-	-2,1 - 4,1	0,083	0,224
P_L2	40	-2,6± 17,06	0,347	+	-8,0 - 2,9	-0,077	0,417
S_L3	38	1,9± 9,75	0,244	+	-1,3 - 2,4	0,058	0,454
P_L3	39	2,9± 12,77	0,170	+	-1,3 - 7,0	0,072	0,450
S_L4	33	1,1± 9,00	0,503	+	-2,1 - 4,3	0,038	0,627
P_L4	33	0,6± 14,52	0,827	+	-4,6 – 5,7	0,254	0,014
P_L1-64*	40	-0,6± 10,74	0,733	+	-4,0 - 2,9	0,110	0,078

t- Test p: p- Wert des t- Test; p\_b: p- Wert der Regressionsanalyse

95 % KI: 95 %- Konfidenzintervall

NV: Normalverteilung (+: Daten normalverteilt; -: Daten nicht normalverteilt)

B\_Sges: Werte der Serumproben über alle Laktationsgruppen

B\_Pges: Werte der Plasmaproben über alle Laktationsgruppen

L1 bis L4: die Laktationsgruppen 1 bis 4 betreffend

\*abzüglich eines extremen Ausreißers (danach liegt Normalverteilung vor)

Für beide Probentypen der Gesamtbetriebsmessungen lagen die meisten deutlichen Abweichungen im mittleren Konzentrationsbereich. Allerdings befand sich in diesem Bereich auch der Großteil der Ergebnisse. Dies erklärte jedoch nicht, warum dort auch die höchsten Abweichungen zu finden waren. Zudem kamen deutlich mehr negative extreme Abweichungen vor. Diese resultierten aus merklich höheren Konzentrationen in den Ausgangswerten der mit der manuellen Methode gemessenen Proben. Möglicherweise ist dies ebenfalls auf die höhere Fehleranfälligkeit der manuellen Methode zurückzuführen.

Unter der Voraussetzung der Normalverteilung liegen 95 % der Differenzen in einem Bereich zwischen ±1,96s ober- oder unterhalb des Mittelwertes der Differenzen (Giavarina 2015). Die mit der automatischen Methode ermittelten Serumkonzentrationen lagen mit 95 %iger Wahrscheinlichkeit in einem Bereich von 19,4 über oder 18,9 mg/ I unter den durch die manuelle Methode ermittelten Werten. Für die Plasmaproben galt entsprechend ein Bereich von 28,7 über und 29,5 mg/ I unter den Werten der manuellen Methode.

Bezüglich der vorliegenden Daten waren diese Bereiche hinsichtlich des oberen Referenzbereiches der Ceruloplasminkonzentration akzeptabel, da derart hohe Werte nicht vorkamen und die Ceruloplasminbestimmung ohnehin kein geeignetes Mittel zur Diagnose einer Überversorgung oder Toxikose ist. Es befanden sich jedoch Konzentrationen einiger gemessener Proben im oder unter dem unteren Referenzbereich. Abhängig von der angewendeten Messmethode und vom zugrunde gelegten Referenzbereich war es möglich, dass adäquat versorgte Tiere in den marginalen oder gar defizitären Bereich übertreten. Natürlich wird eine Mangelsituation nicht ausschließlich an diesen Werten festgemacht, dennoch wäre hier ein engerer Bereich wünschenswert. Zudem gibt es verschiedene empfohlene Referenzbereiche, die sich zum Teil deutlich unterscheiden bzw. überschneiden.

Wie auch bei anderen Untersuchungen zuvor gab es zwischen einzelnen Betrieben und innerhalb einiger Betriebe erhebliche Unterschiede. Viele Messergebnisse der Methoden unterschieden sich nur marginal. Andererseits kamen auch Ergebnisse vor, die sich zwischen den Methoden erheblich unterschieden. Bemerkenswert war außerdem, dass die manuelle Methode für einige Betriebe deutlich höhere Konzentrationen (führten zu negativen Differenzen) ausgab. Einige Beispiele sind in Tabelle 50 dargestellt.

Dabei stellte sich die Frage, ob diese Unterschiede auf die Methode zurückgeführt werden können. Wahrscheinlicher ist, dass es sich dabei um Variationen individueller Ursachen handelte. Hierfür kamen beispielsweise erneut Unterschiede durch ein individuelles Maß an Ceruloplasmin, welches im Gerinnsel zurückbleibt, oder Handhabungsprobleme bei großen Probenmengen bei der manuellen Methode in Frage. Wenn die Ursache in der Methode an sich begründet wäre, erscheint ein konstanter Fehler wahrscheinlicher als solch hohe

Schwankungen. Somit ist auch davon auszugehen, dass sich die errechneten Differenzen tatsächlich in einem deutlich kleineren Schwankungsbereich bewegten.

Tabelle 50: Beispiele für deutliche Differenzen zwischen den mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Konzentrationen der Proben einiger Betriebe (in mg/l)

Bsp. Nr.	LG	Diff	MW	Bsp. Nr.	LG	Diff	MW
	Serum	proben			Plasma	proben	•
1	1	3,9	114	1	1	4,9	241
	2	20,3	167		2	11,1	194
	3	8,8	157		3	25,8	170
	4	10,2	129		4	36,3	166
2	1	3,1	103	2	1	4,3	218
	2	20,0	167		2	2,8	213
	3	15,0	147		3	18,6	216
	4	2,6	135		4	13,4	236
3	1	-19,6	109	3	1	-28,8	180
	2	0,7	130		2	-34,3	252
	3	-24,6	145		3	-22,7	186
	4	-5,8	128		4	-23,3	193
4	1	-20,8	116	4	1	-64,8	206
	2	-21,5	137		2	-24,6	205
	3	-18,4	135		3	-20,1	217
	4	-23,3	149		4	-35,7	182

Diff: Differenz der Cp- Konzentrationen aus den mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Proben

MW: Mittelwert aus den Cp- Konzentrationen der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Proben

LG: Laktationsgruppe

#### 5.6 Serum/ Plasma

Wie unter Punkt 2.2.7 beschrieben, wurde in einigen Studien beobachtet, dass bei gepaarten Proben die Ceruloplasminkonzentrationen der Serum- deutlich unter denen der Plasmaproben liegen. Auch in der vorliegenden Arbeit war das der Fall.

Die Quotienten, die sich aus dem Verhältnis Plasma/ Serum der Betriebsmessungen (Tabelle 39) ergaben, sind deutlich größer als die des Lagerungsversuches (Tabelle 40). Denkbar wäre, dass sich das Verhältnis von Serum zu Plasma über die Lagerungsdauer ändert. Die geringen Unterschiede in der Lagerungsstabilität, die sich aus dem Lagerungsversuch bei Tiefkühllagerungsbedingungen ergaben, sprechen eher gegen diese Theorie.

Bei den Betriebsmessungen gab es teilweise größere zeitliche Unterschiede zwischen dem Probenahme- und Messzeitpunkt. Mit Hilfe der Abbildungen 58 und 59 sollte überprüft werden, ob sich der Quotient aus P/S über die Lagerungsdauer verändert. Dazu sind in den Abbildungen die Quotienten aus P/S der Betriebsmessungen dem zeitlichen Abstand zwischen Probenahme- und Messtag gegenübergestellt.

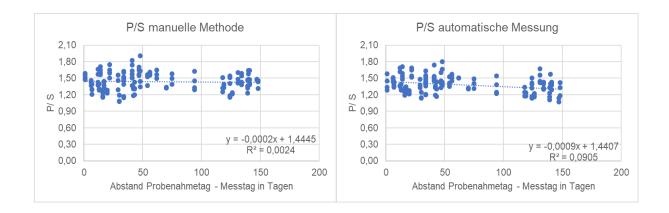


Abbildung 58: Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der manuellen Methode bestimmten Proben der Betriebsmessungen, unter Berücksichtigung des zeitlichen Abstandes zwischen dem Probennahmetag und dem Messtag (n= 141)

Abbildung 59: Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der automatischen Methode bestimmten Proben der Betriebsmessungen, unter Berücksichtigung des zeitlichen Abstandes zwischen dem Probennahmetag und dem Messtag (n= 141)

Auch hier war eine wesentliche Veränderung des Verhältnisses von Serum zu Plasma nicht abzuleiten.

In Tabelle 51 sind jeweils der kleinste und größte ermittelte Quotient und weitere statistische Größen angegeben. Die Unterschiede zwischen den Quotienten und somit zwischen den Betrieben waren zum Teil erheblich.

Tabelle 51: Übersicht über die kleinsten und größten ermittelten Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Proben der Betriebe (Vergleich der Quotienten P/S)

	Min P/S	Max P/ S	MW	SD	Median	n
P/ S_m	1,08	1,91	1,43	0,158	1,44	141
P/ S_a	1,07	1,80	1,38	0,148	1,37	141

P/S\_m: Quotient aus Plasma/ Serum der mit der manuellen Methode bestimmten Werte

P/S\_a: Quotient aus Plasma/ Serum der mit der automatischen Methode bestimmten Werte

Min P/S: kleinster errechneter Quotient aus Plasma/Serum

Max P/S: größter errechneter Quotient aus Plasma/Serum

MW: Mittelwert aus allen ermittelten Quotienten aus Plasma/ Serum

Die Unterschiede innerhalb der Betriebe bzw. zwischen deren Laktationsgruppen waren geringer. Um dies zu prüfen, wurden die maximalen Differenzen zwischen den Quotienten aus P/S der einzelnen Laktationsgruppen innerhalb eines Betriebes für alle untersuchten Betriebe bestimmt. In Tabelle 52 sind von diesen maximalen Differenzen innerhalb eines Betriebes die kleinste und größte Differenz über alle Betriebe sowie der Mittelwert mit Standardabweichung und Median über die Werte der maximalen Differenzen der Betriebe dargestellt.

Tabelle 52: Übersicht über die kleinste und größte Differenz aus allen maximalen Differenzen aus den ermittelten Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Proben der Laktationsgruppen innerhalb der Betriebe (Vergleich der maximalen Differenzen zwischen den Quotienten der Laktationsgruppen innerhalb der Betriebe)

	Min P/S	Max P/S	MW	SD	Median	n
P/ S_m	0,01	0,33	0,16	0,087	0,16	40
P/ S_a	0,01	0,43	0,16	0,102	0,14	40

P/ S\_m: bezüglich der Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der manuellen Methode bestimmten Werte

P/ S\_a: bezüglich der Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der automatischen Methode bestimmten Werte

Min P/S: kleinste Differenz aus den maximalen Differenzen der errechneten Quotienten aus Plasma/ Serum eines Betriebes

Max P/S: größte Differenz aus den maximalen Differenzen der errechneten Quotienten aus Plasma/Serum eines Betriebes

MW: Mittelwert aus allen ermittelten maximalen Differenzen der Quotienten aus Plasma/ Serum eines Betriebes

Diese maximalen Differenzen zwischen den Quotienten aus P/S der einzelnen Laktationsgruppen innerhalb eines Betriebes wurden sowohl für die mit der manuellen als auch die mit der automatischen Methode ermittelten Werte bestimmt. Um die mit der jeweiligen

Methode ermittelten Differenzen vergleichen zu können, wurde für jeden Betrieb deren Differenz ermittelt. Verglich man die mit beiden Messmethoden ermittelten größten Differenzen innerhalb eines Betriebes, kamen viele Betriebe vor, bei denen sich die mit beiden Methoden gemessenen Quotienten der Laktationsgruppen wenig unterschieden. Wohingegen bei manchen Betrieben mit einer Methode nur geringe Unterschiede, mit der anderen Methode aber größere Unterschiede ermittelt wurden. Diese Unterschiede können durch eine individuelle Bindung von Ceruloplasmin im Gerinnsel erklärt werden. Tabelle 53 zeigt zu den Beträgen der Differenzen der aus beiden Methoden bestimmten Werte einige statistische Größen.

Tabelle 53: Vergleich der maximalen Differenzen der Quotienten aus P/S der Laktationsgruppen jeweils eines Betriebes, durch Darstellung des Betrages der Differenz der mit der manuellen und automatischen Methode ermittelten maximalen Differenzen und zugehöriger statistischer Größen

Min IDifferenz P/ SI	Max IDifferenz P/ SI	MW	SD	Median	n
0,00	0,17	0,05	0,048	0,040	40

Min IDifferenz P/ SI: Betrag der Differenz aus den mit der manuellen und automatischen Methode ermittelten maximalen Differenzen der Quotienten aus P/ S der Laktationsgruppen eines Betriebes, kleinster beobachteter Wert

Max IDifferenz P/ SI: Betrag der Differenz aus den mit der manuellen und automatischen Methode ermittelten maximalen Differenzen der Quotienten aus P/ S der Laktationsgruppen eines Betriebes, größter beobachteter Wert

MW: Mittelwert aus den Beträgen der Differenzen aus den mit der manuellen und automatischen Methode ermittelten maximalen Differenzen der Quotienten aus P/S der Laktationsgruppen eines Betriebes

Median: Median aus den Beträgen der Differenzen aus den mit der manuellen und automatischen Methode ermittelten maximalen Differenzen der Quotienten aus P/S der Laktationsgruppen eines Betriebes

Die Beobachtung größerer Unterschiede im Verhältnis von Plasma zu Serum deckten sich mit den unter Punkt 2.2.7 beschriebenen Erfahrungen anderer Autoren. Innerhalb der Betriebe waren die Differenzen zwischen den Serum- und Plasmaproben geringer.

Die in dieser Arbeit ermittelten Unterschiede lagen in einem Bereich, der auch in anderen Quellen ermittelt wurde. In einer Studie von Hussein (2012) lagen die Serumwerte etwa 30 % unter denen der Plasmaproben. In einer anderen Studie wurden Unterschiede zwischen 13 und 40 % ermittelt (Paynter 1982).

# 5.7 Einzelwerte/ Poolproben

Auch bei dieser Untersuchung waren die Ergebnisse sehr variabel. So gab es Betriebe deren Einzelwerte nahezu identisch mit den gemessenen Poolproben waren, demgegenüber standen jedoch auch stark abweichende Resultate. Nach der Etablierung der Methode wurde der Versuch erneut durchgeführt und lieferte deutlich höhere Korrelationskoeffizienten. Demnach ist es grundsätzlich sinnvoll und zulässig, aus den Einzelproben Poolproben zu erzeugen.

# 6 Schlussfolgerung

Die Vielzahl der vorgestellten Verfahren zur quantitativen Ceruloplasminbestimmung legt nahe, dass ein Verfahren, welches sich als besonders geeignet erwiesen hat, bisher nicht gefunden werden konnte. Sollen im Rahmen der Bestandsbetreuung viele Blutproben labordiagnostisch untersucht werden, erschien ein manuelles Messverfahren zur Ceruloplasminbestimmung aufgrund des geringen Durchsatzes nicht geeignet. Mit einem automatisierten Verfahren ist die Bearbeitung weitaus größerer Probenmengen möglich.

Grundsätzlich werden verschiedene Anforderungen an ein Messverfahren gestellt. Eine Methode zur manuellen Ceruloplasminbestimmung ist das Verfahren nach Sunderman und Nomoto (1970). Um zu überprüfen, ob ein daraus abgeleitetes automatisiertes Messverfahren geeignet ist, musste überprüft werden, ob diese Anforderungen erfüllt werden. Dazu zählte eine hohe Präzision der Messungen in der Serie und von Tag zu Tag. Die hier ermittelten intraday- Variationskoeffizienten für Serumproben betrugen für die manuelle Methode 0,012 und 0,015 sowie 0,010 und 0,024 für die automatische Methode. Für die Plasmaproben lauteten die entsprechenden Koeffizienten für die manuelle Methode 0,020 und 0,032 sowie 0,011 für die automatische Methode. Die für die Präzision von Tag zu Tag ermittelten Variationskoeffizienten waren von der zugrunde gelegten Untersuchung und dem betrachteten Zeitraum abhängig. Alle ermittelten interday- Variationskoeffizienten waren kleiner als 0,09. Sowohl für die manuelle als auch die automatische Methode konnte eine gute Reproduzierbarkeit nachgewiesen werden. Dies gilt auch im Vergleich mit in anderen Studien untersuchten Methoden zur Ceruloplasminbestimmung.

In bereits erfolgten Untersuchungen wurde herausgefunden, dass Chlorid einen hemmenden Einfluss auf die Reaktion hat. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass der hemmende Einfluss linear mit der Chloridkonzentration zunimmt. Die Chloridkonzentration ist unter anderem vom Verdünnungsgrad der Probe abhängig. Für die hier verwendeten Verdünnungen war der Effekt zu vernachlässigen, allerdings sollten die Lösungen nicht mit Kochsalzlösung, sondern mit Aqua dest. hergestellt werden.

Die Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration in einem Labor setzt eine gewisse Lagerungsstabilität des Akute- Phase- Proteins in den Blutproben voraus. Gewonnene Proben konnten über einige Tage (5- 7 Tage) stabil bei Raumtemperatur (20°C) oder im Kühlschrank (8°C) gelagert werden. Auch mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben beeinflusste die

Konzentration nicht wesentlich. Eine Lagerung für ein Jahr bei -20°C verminderte die Ceruloplasminaktivität um ca. 10- 14 %. Ceruloplasmin besitzt somit eine ausreichende Stabilität, um als Laborparameter für routinemäßige Untersuchungen eingesetzt werden zu können.

Aus dem Großteil der gewonnen Proben erfolgte die Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration parallel mit der manuellen und automatischen Methode. Bezüglich der Proben der gemessenen Betriebe wurden mit beiden Messverfahren in der postpartalen Phase die höchsten Konzentrationen ermittelt. Nach der Geburt laufen im Muttertier Umbauprozesse ab, welche physiologischerweise mit einer Akute- Phase- Reaktion und somit auch einem Anstieg der Konzentration von Akute- Phase- Proteinen einhergehen.

Außerdem wurde mit den aus den parallelen Messungen gewonnenen Daten ein Methodenvergleich zwischen dem manuellen und automatischen Verfahren angestellt. Zunächst erfolgte die Bestimmung der Koeffizienten der Pearson- Korrelation. Sämtliche Koeffizienten lagen über 0,84 und wiesen somit eine hohe Korrelation der mit beiden Methoden bestimmten Werte nach. Da sich beide Messverfahren grundlegend unterscheiden, können die Werte der automatischen Messung nicht direkt mit denen der manuellen Methode verglichen werden. Dies gilt beispielsweise auch für Referenzwerte oder eine zukünftige Anwendung der automatischen Methode. Aus parallelen Messungen konnte ein Korrekturfaktor bestimmt werden. Mit diesem können die Werte der automatischen Messung angepasst und weiter mit denen der manuellen Methode verglichen werden. Die aus den Kontroll- und Betriebsmessungen ermittelten Faktoren für Serum- und Plasmaproben waren ähnlich. Sie lagen zwischen 1,30 und 1,42 und waren somit niedriger als ein ermittelter theoretischer Korrekturfaktor von 1,74. Beim Vergleich zweier Messverfahren zur Bestimmung desselben Wertes waren hohe Korrelationskoeffizienten grundsätzlich zu erwarten. Daher war die Ermittlung der Pearson- Korrelationskoeffizienten zum Methodenvergleich unzureichend. besser eignete sich eine Bland- Altman- Analyse. Ohne die Anwendung der oben genannten Korrekturfaktoren ergab der Mittelwert der Differenzen der Serumproben, dass die mit der automatischen Methode gemessenen Konzentrationen 34± 9,6 mg/ I unter den mit der manuellen Methode bestimmten Ceruloplasminkonzentrationen lagen. Für Plasmaproben waren es entsprechend 55± 14,2 mg/ l. Nach der Anwendung der ermittelten Korrekturfaktoren wurde mit der Bland- Altmann- Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit beiden Methoden parallel bestimmten Ceruloplasminkonzentrationen nachgewiesen. Demnach kann die automatische Methode unter Verwendung der Korrekturfaktoren alternativ zur manuellen Methode eingesetzt werden.

Der Vergleich von Serum- und Plasmaproben bestätigte die Ergebnisse anderer Studien. Grundsätzlich ist die Ceruloplasminkonzentration in Serumproben geringer als in gepaarten Plasmaproben. Dies liegt möglicherweise daran, dass Ceruloplasmin bei der Koagulation im Gerinnsel gebunden und somit der Reaktion entzogen wird. Das Ausmaß dieser Verminderung der Ceruloplasminkonzentration in Serumproben ist sehr unterschiedlich. Zwischen einzelnen Betrieben bestanden diesbezüglich sehr große Schwankungen. Der Unterschied zwischen den Laktationsgruppen innerhalb einzelner Betriebe war geringer. Bedingt durch den individuellen Anteil des in den Gerinnseln der Serumproben gebundenen Ceruloplasmins bietet die Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration aus Plasmaproben einen Vorteil gegenüber der Bestimmung aus Serumproben. Zudem sollte bereits bei der Probennahme auf eine ausreichende Gerinnungshemmung bei Plasmaproben geachtet werden.

Außerdem wurde überprüft, inwiefern die Mittelwerte von separat gemessenen Proben mit den Ergebnissen der daraus hergestellten Poolproben übereinstimmen. Auch hier lag eine hohe Korrelation vor, sodass die Untersuchung von Poolproben zur Ceruloplasminbestimmung geeignet ist.

Die Bindung von Ceruloplasmin im Blutgerinnsel war wahrscheinlich die Ursache für viele der aufgetretenen Ungenauigkeiten einzelner Untersuchungen und kann als grundsätzliches Problem der Ceruloplasminbestimmung angesehen werden. Bereits zu Beginn der Untersuchung fielen Gerinnsel in einigen Proben auf. Ein Wechsel der Probenröhrchen verbesserte dieses Problem, es trat jedoch weiterhin auf. Prinzipiell ließen sich sehr viele der abweichenden Werte der durchgeführten Untersuchungen durch dieses Phänomen erklären. Dieses wirkte sich schließlich negativ auf die Genauigkeit der Ergebnisse der verschiedenen Versuche aus. Dies galt sowohl für die manuelle als auch die automatisierte Methode. Ein wesentlicher Einfluss war somit auch auf die Bland- Altman- Analyse denkbar. Auf der anderen Seite konnte ein Teil der Problemursachen nicht identifiziert werden. Zusammenfassend sind die Fehlerquellen eher außerhalb der Methode an sich zu suchen. Insgesamt war die automatisierte Methode im Vergleich mit der manuellen Methode jedoch deutlich weniger fehlerbehaftet und ist grundsätzlich zur exakten und reproduzierbaren Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration geeignet.

Die Durchführung von Doppelbestimmung ermöglichte es, abweichende Werte zu erkennen. Zudem bot die parallele Bestimmung von Kontrollproben eine weitere Absicherung. Idealerweise sollte dafür ein Ceruloplasminstandard bekannter Konzentration verwendet werden. Für diese Arbeit war ein Ceruloplasminstandard am Markt nicht verfügbar.

Darüber hinaus war die Durchführung der Untersuchung am Messautomaten mit einem deutlich geringeren Chemikalieneinsatz möglich. Auf das giftige Natriumazid konnte sogar

vollständig verzichtet werden. Der geringere Verbrauch an Küvetten war ein weiterer Vorteil. Zudem lieferte die automatische Methode in kürzerer Zeit Ergebnisse. Verglichen mit der manuellen Methode war somit ein wesentlich höherer Durchsatz möglich. Die automatisierte Methode bietet also sowohl ökonomische als auch ökologische Vorteile gegenüber der manuellen Messmethode.

### 7 Zusammenfassung

# Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration im Blutserum und Blutplasma von Milchkühen

Die Bestandsbetreuung ist Teil der tierärztlichen Arbeit im Milchviehbetrieb. Sie umfasst die Überwachung verschiedener Parameter zur Einschätzung der Tiergesundheit. Eine wichtige Rolle spielt in diesem Zusammenhang die Kupferversorgung der Rinder. Zu deren Untersuchung kann die Messung des Akute- Phase- Proteins Ceruloplasmin in Blutproben hilfreich sein. Bisher wurden verschiedene Verfahren zu dessen labordiagnostischer Bestimmung beschrieben. Die große Anzahl an entwickelten Untersuchungsmethoden legt nahe, dass noch kein Verfahren gefunden werden konnte, welches allen Anforderungen genügt.

Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die Ceruloplasminbestimmung im Rinderblut und die Etablierung eines automatisierten Verfahrens auf der Grundlage der manuellen Methode nach Sunderman und Nomoto (1970).

Die Probengewinnung für diese Untersuchung erfolgte im Rahmen der Bestandsbetreuung durch die Klinik für Klauentiere der Freien Universität Berlin. Der Zeitraum der Probensammlung erstreckte sich von 2014 bis 2017. Indikationen waren Routinebesuche zur Erhebung eines Status quo und dem Erkennen eines möglichen Verbesserungspotentials bis hin zur Lösung spezifischer Bestandsprobleme. Die untersuchten Tiere wurden nach Laktationsstatus in vier Gruppen eingeteilt.

Zunächst wurden Untersuchungen zur Präzision des manuellen und automatischen Messverfahrens durchgeführt. Die ermittelten intraday- Variationskoeffizienten für Serumproben betrugen für die manuelle Methode 0,012 und 0,015 sowie 0,010 und 0,024 für die automatische Methode. Für die Plasmaproben lauteten die entsprechenden Koeffizienten für die manuelle Methode 0,020 und 0,032 sowie 0,011 für die automatische Methode. Die für die Präzision von Tag zu Tag ermittelten Variationskoeffizienten waren von der zugrunde gelegten Untersuchung und dem betrachteten Zeitraum abhängig. Die niedrigsten Koeffizienten konnten über den Lagerungsversuch bei Kühlschranktemperatur ermittelt werden. Für die Serumproben betrug der interday- Variationskoeffizient 0,029 und 0,021 für die entsprechenden Plasmaproben. Die aus den Kontrollproben gewonnenen Werte betrugen 0,038 bzw. 0,047. Nach der Etablierung der Methode konnten interday- Variationskoeffizienten unter 0,088 aus Serum- bzw. unter 0,086 aus Plasmaproben erzielt werden. Die

Variationskoeffizienten des Lagerungsversuches wurden über 12 Tage, also einen sehr viel kürzeren Zeitraum als bei den anderen hier durchgeführten Untersuchungen (ca. 1 Jahr) ermittelt. Alle ermittelten interday- Variationskoeffizienten waren kleiner als 0,09. Sowohl für die manuelle als auch die automatische Methode konnte eine hohe Präzision in der Serie und von Tag zu Tag nachgewiesen werden. Dies gilt auch im Vergleich mit in anderen Studien untersuchten Methoden zur Ceruloplasminbestimmung.

In bereits erfolgten Untersuchungen wurde herausgefunden, dass Chlorid einen hemmenden Einfluss auf die Reaktion hat. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es wurde nachgewiesen, dass der hemmende Einfluss linear mit der Chloridkonzentration zunimmt.

Die Stabilität der Ceruloplasminkonzentration in Blutproben wurde unter verschiedenen Bedingungen in einem Lagerungsversuch untersucht. Gewonnene Proben konnten über einige Tage (5- 7 Tage) stabil bei Raumtemperatur (20°C) oder im Kühlschrank (8°C) gelagert werden. Auch mehrfaches Einfrieren und Auftauen der Proben beeinflusste die Konzentration nicht wesentlich. Eine Lagerung für ein Jahr bei -20°C verminderte die Ceruloplasminaktivität um ca. 10- 14 %, bzw. fiel die Ceruloplasminkonzentration in Serumproben in 30 Tagen um ca. 1,2 und in Plasmaproben um ca. 1,3 mg /l ab.

Die nach Laktationsgruppen getrennte Auswertung der untersuchten Betriebe zeigte, dass die Ceruloplasminkonzentration nach der Kalbung am höchsten war. Der Mittelwert der mit der manuellen Methode bestimmten Konzentrationen in Serumproben betrug 160± 22,6 bzw. 227± 31,6 mg/ I in Plasmaproben. Mit der automatischen Methode wurden Werte von 123± 18,8 bzw. 166± 21,8 mg/ I ermittelt.

Der Vergleich der beiden Messmethoden lieferte hohe Pearson- Korrelationskoeffizienten. Für die mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten Konzentrationen in Serumproben betrug der Korrelationskoeffizient 0,922 (p< 0,001) bzw. 0,868 (p< 0,001) in Plasmaproben. Zudem wurden Korrekturfaktoren ermittelt, um die Ergebnisse der manuellen mit denen der automatischen Methode vergleichen zu können. Sie lagen zwischen 1,30 und 1,42 und waren somit niedriger als der theoretische Korrekturfaktor von 1,74. Die Bland-Altman- Analyse ohne Anwendung der Korrekturfaktoren ergab, dass die mit der automatischen Methode ermittelten Konzentrationen in Serumproben 34± 9,6 mg/ I unter den mit der manuellen Methode ermittelten Ceruloplasminkonzentrationen lagen. Plasmaproben waren es entsprechend 55± 14,2 mg/ l. Nach der Anwendung der ermittelten Korrekturfaktoren wurde mit der Bland- Altmann- Analyse kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den mit beiden Methoden parallel bestimmten Ceruloplasminkonzentrationen nachgewiesen.

Der Vergleich von Serum- und Plasmaproben zeigte, dass die Ceruloplasminkonzentrationen in Serumproben geringer als in den zugehörigen Plasmaproben waren. Das Verhältnis der Konzentrationen in gepaarten Serum- und Plasmaproben war sehr variabel. Die ermittelten Quotienten aus den Konzentrationen beider Probenarten lagen zwischen 1,07 und 1,91. Aus den Betriebsmessungen ergaben sich über alle Laktationsgruppen Quotienten von 1,43 für die manuelle und 1,37 für die automatische Methode. Zwischen einzelnen Betrieben waren die Abweichungen größer als zwischen den Laktationsgruppen innerhalb der Betriebe.

Es wurden die Konzentrationen von separaten Plasmaproben und den daraus hergestellten Poolproben ermittelt. Aus den Mittelwerten der separaten Proben und den Ergebnissen der Poolproben resultierte ein Pearson- Korrelationskoeffizient von 0,978 (p< 0,001).

Das automatisierte Messverfahren bietet gegenüber der manuellen Methode sowohl ökonomische als auch ökologische Vorteile. Es lieferte präzise reproduzierbare Ergebnisse und kann unter Berücksichtigung von Korrekturfaktoren als Alternative zum manuellen Verfahren nach Sunderman und Nomoto (1970) zur routinemäßigen Bestimmung der Ceruloplasminkonzentration aus Rinderblutproben verwendet werden.

### 8 Summary

# Determination of the concentration of Ceruloplasmin in blood serum and blood plasma of dairy cows

Herd supervision belongs to veterinary work in the dairy farming. It includes the monitoring of various parameters for the assessment of animal health. In this context, the copper supply of cattle plays an important role. The measurement of the acute- phase- protein ceruloplasmin in blood samples may be helpful for its investigation. So far, several methods have been described for laboratory diagnostic analysis of ceruloplasmin. However this supports that no method has been found which meets all requirements.

The aim of the present study was to determine ceruloplasmin in cattle blood and to establish an automated procedure based on the manual method according to Sunderman and Nomoto (1970).

Samples for this study have been collected during regular visits by the veterinary ambulance of the clinic for claw animals of the Free University of Berlin. The period of the sample collection was between 2014 to 2017. Indications included routine visits, visits to identify options for improval or to solve specific questions. The examined animals were divided into four groups by lactation status.

First of all, the precision of the manual and automated measuring methods was investigated. The intra- assay coefficients of variations for serum samples were 0.012 and 0.015 for the manual method and 0.010 and 0.024 for the automated method. For plasma samples, the corresponding coefficients for the manual method were 0.020 and 0.032 as well as 0.011 for the automated method. The coefficients of variations determined for day- to- day precision depended on the underlying study and the period considered. The lowest coefficients could be determined for the storage experiment at refrigerator temperature. For serum samples, the interday variation coefficient was 0.029 and 0.021 for the corresponding plasma samples. The values calculated from the control samples were 0.038 and 0.047, respectively. After establishing the method, interday coefficients of variations below 0.088 could be obtained from serum samples and less than 0.086 for plasma samples. The coefficients of variations of the storage experiment were determined over 12 days, i.e. a much shorter period of time than in the other tests of this study (about 1 year). All interday coefficients of variations were less than 0.09. For both the manual and the automated method, high precision in the series and from

day to day could be proven. This also applies in comparison with methods for ceruloplasmin analysis which have been investigated in other studies.

In previous studies, it has been found that chloride has an inhibitory effect on the reaction. This effect was confirmed in the present work. It has been shown that the inhibitory influence increases linearly with the chloride concentration.

The stability of ceruloplasmin concentration in blood samples was tested under various conditions in a storage trial. Samples collected could be stored stable for a few days (5-7 days) at room temperature (20°C) or in the refrigerator (8°C). Multiple freezing and thawing of the samples did not considerably affect the concentration. Storage for one year at -20°C reduced the ceruloplasmin activity by approx. 10- 14 %, or the ceruloplasmin concentration decreased by approx. 1.2 in serum samples and by approx. 1.3 mg / I in 30 days in plasma samples.

Dividing the samples into lactation groups showed that the ceruloplasmin concentration was highest after calving. The mean value measured by the manual method in serum samples was  $160\pm22.6$  and  $227\pm31.6$  mg/l in plasma samples, respectively. Values of  $123\pm18.8$  and  $166\pm21.8$  mg/l were determined by the automated method.

The comparison of the two methods provided high Pearson correlation coefficients. For the concentrations determined by the manual and automated method in serum samples, the correlation coefficient was 0.922 (p< 0.001) and 0.868 (p< 0.001) in plasma samples, respectively. Correction factors were determined to compare the results of the manual methods with those of the automated method. They were between 1.30 and 1.42 and were thus lower than the theoretical correction factor of 1.74. The Bland- Altman analysis without applying the correction factors showed that the serum concentrations of the automated method was  $34\pm9.6$  mg / I lower than the ceruloplasmin concentrations determined by the manual method. For plasma samples it was  $55\pm14.2$  mg / I, respectively. Following the application of the correction factors determined, the Bland- Altmann analysis showed no statistically significant difference of the ceruloplasmin concentrations when comparing both methods.

The comparison of serum and plasma samples showed that the ceruloplasmin concentrations in serum samples were lower than in the corresponding plasma samples. Moreover the ratio of concentrations in paired serum and plasma samples was very variable. The quotients from the concentrations of both types of samples were between 1.07 and 1.91. The measurements of the farms showed quotients of 1.43 for the manual method and 1.37 for the automatic method across all lactation groups. Between individual farms the differences were greater than between the lactation groups within the farms.

The concentrations of separate plasma samples and the pool samples prepared therefrom were determined. The mean values of the separate samples and the outcome of the pool samples resulted in a Pearson correlation coefficient of 0.978 (p < 0.001).

The automated measuring method offers both economic and ecological advantages over the manual method. It provides precise and reproducible results and can be used with correction factors as an alternative to the manual method of Sunderman and Nomoto (1970) for the routine analysis of ceruloplasmin concentrations from bovine blood samples.

#### 9 Literaturverzeichnis

Abdallah, A., Hewson, J., Francoz, D., Selim, H., Buczinski, S. (2016): Systematic review of the diagnostic accuracy of haptoglobin, serum amyloid A, and fibrinogen versus clinical reference standards for the diagnosis of bovine respiratory disease. J Vet Intern Med 30, 1356-1368.

Aldred, A.R., Grimes, A., Schreiber, G., Mercer, J.F.B. (1987):

Rat ceruloplasmin- molecular- cloning and gene- expression in liver, choroid- plexus, yolk-sac, placenta, and testis.

J Biol Chem 262, 2875-2878.

Ammerman, C.B. (1970):

Trace minerals- recent developments in cobalt and copper in ruminant nutrition- a review. J Dairy Sci 53, 1097-1107.

Aprison, M.H., Grosz, H.J. (1958):

Ascorbic acid level and lag time in oxidation of N, N dimethyl- p- phenylenediamine; correlation in sera of normal controls, psychotic patients, and animals. AMA Arch Neurol Psychiatry 79, 575-579.

Arredondo, M., Munoz, P., Mura, C.V., Nunez, M.T. (2003): DMT1, a physiologically relevant apical Cu1+ transporter of intestinal cells.

Am J Physiol Cell Physiol 284, C1525-C1530.

Aytekin, I., Kaya, F., Atalay, H. (2016):

Evaluation of serum haptoglobin, ceruloplasmin and pseudocholinesterase levels in cows with botulism.

Kafkas Univ Vet Fak Derg 22, 367-371.

Balemi, S.C., Grace, N.D., West, D.M., Smith, S.L., Knowles, S.O. (2010): Accumulation and depletion of liver copper stores in dairy cows challenged with a Cudeficient diet and oral and injectable forms of Cu supplementation. N Z Vet J 58, 137-141.

Bartee, M.Y., Lutsenko, S. (2007):

Hepatic copper- transporting ATPase ATP7B: function and inactivation at the molecular and cellular level.

Biometals 20, 627-637.

Baydar, E., Dabak, M. (2014):

Serum iron as an indicator of acute inflammation in cattle. J Dairy Sci 97, 222-228.

o Daily Col 01, 222 220.

Bertinato, J., L'Abbe, M.R. (2004):

Maintaining copper homeostasis: regulation of copper- trafficking proteins in response to copper deficiency or overload.

J Nutr Biochem 15, 316-322.

Bickhardt, K. (1992):

Tabellen und Referenzwerte.

In: Kompendium der Allgemeinen Inneren Medizin und Pathophysiologie für Tierärzte. Pareys Studientexte 69, Verlag Parey, Berlin, Hamburg.

Bidewell, C.A., David, G.P., Livesey, C.T. (2000):

Copper toxicity in cattle.

Vet Rec 147, 399-400.

Bidewell, C.A., Drew, J.R., Payne, J.H., Sayers, A.R., Higgins, R.J., Livesey, C.T. (2012): Case study of copper poisoning in a British dairy herd. Vet Rec 170, 464-U471.

Blakley, B.R., Hamilton, D.L. (1985):

Ceruloplasmin as an indicator of copper status in cattle and sheep.

Can J Comp Med 49, 405-408.

Bland, J.M., Altman, D.G. (1995):

Multiple significance tests - the Bonferroni method .10.

BMJ 310, 170-170.

Boivin, S., Aouffen, K., Fournier, A., Mateescu, M.A. (2001):

Molecular characterization of human and bovine ceruloplasmin using MALDI- TOF mass spectrometry.

Biochem Biophys Res Commun 288, 1006-1010.

Bonham, M., O'Connor, J.M., Hannigan, B.M., Strain, J.J. (2002):

The immune system as a physiological indicator of marginal copper status? Br J Nutr 87, 393-403.

Broderius, M.A., Prohaska, J.R. (2009):

Differential impact of copper deficiency in rats on blood cuproproteins.

Nutr Res 29, 494-502.

Brodzki, P., Kostro, K., Brodzki, A., Wawron, W., Marczuk, J., Kurek, L. (2015):

Inflammatory cytokines and acute- phase proteins concentrations in the peripheral blood and uterus of cows that developed endometritis during early postpartum.

Theriogenology 84, 11-18.

Cabrera, A., Alonzo, E., Sauble, E., Chu, Y.L., Nguyen, D., Linder, M.C., Sato, D.S., Mason, A.Z. (2008):

Copper binding components of blood plasma and organs, and their responses to influx of large doses of (65)Cu, in the mouse.

Biometals 21, 525-543.

Calabrese, L., Malatesta, F., Barra, D. (1981):

Purification and properties of bovine caeruloplasmin.

Biochem J 199, 667-673.

Campbell, C.H., Brown, R., Linder, M.C. (1981):

Circulating ceruloplasmin is an important source of copper for normal and malignant animal-cells.

Biochim Biophys Acta 678, 27-38.

Carroll, J.A., Sanchez, N.C.B. (2014):

Bill E. Kunkle Interdisciplinary Beef Symposium: Overlapping physiological responses and endocrine biomarkers that are indicative of stress responsiveness and immune function in beef cattle.

J Anim Sci 92, 5311-5318.

Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira, V., Benedito, J.L. (2005): Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. Vet J 169, 286-292.

Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Sauerwein, H. (2012): Acute phase proteins in ruminants. J Proteomics 75, 4207-4231.

Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Martinez-Subiela, S. (2005): Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives.

Vet Clin Pathol 34, 85-99.

Ceron, J.J., Martinez-Subiela, S. (2004):

An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. Vet Res 35, 671-679.

Cerone, S.I., Sansinanea, A.S., Streitenberger, S.A., Garcia, M.C., Auza, N.J. (1998): The effect of copper deficiency on the peripheral blood cells of cattle. Vet Res Commun 22, 47-57.

Chan, J.P.W., Chang, C.C., Hsu, W.L., Liu, W.B., Chen, T.H. (2010): Association of increased serum acute- phase protein concentrations with reproductive performance in dairy cows with postpartum metritis. Vet Clin Pathol 39, 72-78.

Claypool, D.W., Adams, F.W., Pendell, H.W., Hartmann, N.A., Bone, J.F. (1975): Relationship between level of copper in blood- plasma and liver of cattle. J Anim Sci 41, 911-914.

Colombo, J.P., Richterich, R. (1964):

Zur Bestimmung des Caruloplasmins im Plasma.

Schweiz Med Wochenschr 94, 715-720.

Cousins, R.J. (1985):

Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin.

Physiol Rev 65, 238-309.

Cox, D.W. (1966):

Factors influencing serum ceruloplasmin levels in normal individuals.

J Lab Clin Med 68, 893-904.

Crawshaw, T. (2002):

Possible influence of genetics on copper poisoning in cattle.

Cattle Pract 10, 287-288.

Cray, C., Rodriguez, M., Zaias, J., Altman, N.H. (2009):

Effects of storage temperature and time on clinical biochemical parameters from rat serum. J Am Assoc Lab Anim Sci 48, 202-204.

Cuhadar, S., Koseoglu, M., Atay, A., Dirican, A. (2013):

The effect of storage time and freeze- thaw cycles on the stability of serum samples. Biochem Med 23, 70-77.

Curzon, G. (1961):

Some properties of coupled iron- caeruloplasmin oxidation systems.

Biochem J 79, 656-663.

Curzon, G. (1966):

The inhibition of caeruloplasmin by azide.

Biochem J 100, 295-302.

Dabbagh, K., Laurent, G.J., Shock, A., Leoni, P., Papakrivopoulou, J., Chambers, R.C. (2001):

Alpha- 1- antitrypsin stimulates fibroblast proliferation and procollagen production and activates classical MAP kinase signalling pathways.

J Cell Physiol 186, 73-81.

Davalos, D., Akassoglou, K. (2012):

Fibrinogen as a key regulator of inflammation in disease.

Semin Immunopathol 34, 43-62.

Dirksen, G.G., H.- D.; Stöber, M. (2006):

Kupfermangel.

In: Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.

Parey, Stuttgart. pp. 1266-1271.

Du, Z., Hemken, R.W., Harmon, R.J. (1996):

Copper metabolism of Holstein and Jersey cows and heifers fed diets high in cupric sulfate or copper proteinate.

J Dairy Sci 79, 1873-1880.

Ebersole, J.L., Cappelli, D. (2000):

Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases.

Periodontol 2000 23, 19-49.

Eckersall, P.D. (2000):

Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals.

Rev Med Vet (Toulouse) 151, 577-584.

Erel, O. (1998):

Automated measurement of serum ferroxidase activity.

Clin Chem 44, 2313-2319.

Foss, T.R., Wiseman, R.L., Kelly, J.W. (2005):

The pathway by which the tetrameric protein transthyretin dissociates.

Biochemistry 44, 15525-15533.

Fournier, T., Medjoubi-N, N., Porquet, D. (2000):

Alpha- 1- acid glycoprotein.

Biochim Biophys Acta 1482, 157-171.

Fürll, M. (2013):

Spezielle Untersuchungen beim Wiederkäuer.

In: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.

Schattauer, Stuttgart. pp. 762.

Fuss, C., Palmaz, J.C., Sprague, E.A. (2001):

Fibrinogen: structure, function, and surface interactions.

J Vasc Interv Radiol 12, 677-682.

Ganheim, C., Hulten, C., Carlsson, U., Kindahl, H., Niskanen, R., Waller, K.P. (2003):

The acute phase response in calves experimentally infected with bovine viral diarrhoea virus and/ or Mannheimia haemolytica.

J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50, 183-190.

Garcinuno, B., Ojeda, I., Moreno-Guzman, M., Gonzalez-Cortes, A., Yanez-Sedeno, P., Pingarron, J.M. (2014):

Amperometric immunosensor for the determination of ceruloplasmin in human serum and urine based on covalent binding to carbon nanotubes- modified screen- printed electrodes. Talanta 118, 61-67.

Garrick, M.D., Dolan, K.G., Horbinski, C., Ghio, A.J., Higgins, D., Porubcin, M., Moore, E.G., Hainsworth, L.N., Umbreit, J.N., Conrad, M.E., Feng, L., Lis, A., Roth, J.A., Singleton, S., Garrick, L.M. (2003):

DMT1: a mammalian transporter for multiple metals.

Biometals 16, 41-54.

Gelfert, C.C., Staufenbiel, R. (1998):

Disorders in trace element status in cattle under the point of view of herd supervision part 1: classical trace elements.

Tieraerztl Prax G N 26, 55-66.

Gengelbach, G.P., Spears, J.W. (1998):

Effects of dietary copper and molybdenum on copper status, cytokine production, and humoral immune response of calves.

J Dairy Sci 81, 3286-3292.

Giannetto, C., Casella, S., Giudice, E., Marafioti, S., Fazio, F., Piccione, G. (2012): Daily rhythms of acute phase proteins in cattle under different natural environmental conditions.

Livest Sci 149, 195-200.

Giavarina, D. (2015):

Understanding Bland Altman analysis.

Biochem Med (Zagreb) 25, 141-151.

Godson, D.L., Campos, M., AttahPoku, S.K., Redmond, M.J., Cordeiro, D.M., Sethi, M.S., Harland, R.J., Babiuk, L.A. (1996):

Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease.

Vet Immunol Immunopathol 51, 277-292.

Gooptu, B., Lomas, D.A. (2009):

Conformational pathology of the serpins: themes, variations, and therapeutic strategies. Annu Rev Biochem 78, 147-176.

Gould, L., Kendall, N.R. (2011):

Role of the rumen in copper and thiomolybdate absorption.

Nutr Res Rev 24, 176-182.

Gozho, G.N., Krause, D.O., Plaizier, J.C. (2007):

Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain- induced subacute ruminal acidosis in dairy cows.

J Dairy Sci 90, 856-866.

Grace, N., Knowles, S. (2015):

Taking action to reduce the risk of copper toxicity in cattle.

Vet Rec 177, 490-491.

Grace, N.D., Knowles, S.O., Hittmann, A.R. (2010):

High and variable copper status identified among dairy herds in the Waikato region by concentrations of Cu in liver sourced from biopsies and cull cows.

N Z Vet J 58, 130-136.

Greville, G.D. (1962):

Report of the commission on enzymes of the international union of biochemistry. Nutr Rev 20, 255-256.

Hansen, S.L., Spears, J.W. (2009):

Bioaccessibility of iron from soil is increased by silage fermentation.

J Dairy Sci 92, 2896-2905.

Hansen, S.L., Trakooljul, N., Liu, H.C.S., Hicks, J.A., Ashwell, M.S., Spears, J.W. (2010): Proteins involved in iron metabolism in beef cattle are affected by copper deficiency in combination with high dietary manganese, but not by copper deficiency alone. J Anim Sci 88, 275-283.

Heegaard, P.M.H., Godson, D.L., Toussaint, M.J.M., Tjornehoj, K., Larsen, L.E., Viuff, B., Ronsholt, L. (2000):

The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A (SAA) in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus.

Vet Immunol Immunopathol 77, 151-159.

Heggemann, V. (2014):

Untersuchungen zur Diagnostik der Spurenelementversorgung von Holstein- Friesian-Milchkühen. In: Dissertation, Klinik für Klauentiere des Fachbereichs Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin.

Hellman, N.E., Gitlin, J.D. (2002):

Ceruloplasmin metabolism and function.

Annu Rev Nutr 22, 439-458.

Henry, R.J., Chiamori, N., Jacobs, S.L., Segalove, M. (1960):

Determination of ceruloplasmin oxidase in serum.

Proc Soc Exp Biol Med 104, 620-624.

Henschen, A. (1983):

On the structure of functional sites in fibrinogen.

Thromb Res Suppl 5, 27-39.

Herdt, T.H., Hoff, B. (2011):

The use of blood analysis to evaluate trace mineral status in ruminant livestock. Vet Clin North Am Food Anim Pract 27, 255-282.

Hirvonen, J., Pyorala, S. (1998):

Acute- phase response in dairy cows with surgically- treated abdominal disorders. Vet J 155, 53-61.

Houchin, O.B. (1958):

A rapid colorimetric method for the quantitative determination of copper oxidase activity (ceruloplasmin).

Clin Chem 4, 519-522.

Huang, Z.Q., Ung, T. (2013):

Effect of alpha- 1- acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. Curr Drug Metab 14, 226-238.

Huebers, H.A., Finch, C.A. (1987):

The physiology of transferrin and transferrin receptors.

Physiol Rev 67, 520-582.

Hughes, H.D., Carroll, J.A., Sanchez, N.C.B., Richeson, J.T. (2014):

Natural variations in the stress and acute phase responses of cattle.

Innate Immun 20, 888-896.

Humoller, F.L., Majka, F.A., Barak, A.J., Stevens, J.D., Holthaus, J.M. (1958):

Determination of plasma amine oxidase activity.

Clin Chem 4, 1-12.

Humphries, W.R., Phillippo, M., Young, B.W., Bremner, I. (1983):

The influence of dietary iron and molybdenum on copper- metabolism in calves.

Br J Nutr 49, 77-86.

Hussein, H. (2012):

Ceruloplasmin activity in Holstein dairy cows: effects of lactation stages and anticoagulants 21, 705- Comp Clin Path 710.

Hussein, H.A., Staufenbiel, R. (2011):

Variations in copper concentration and ceruloplasmin activity of dairy cows in relation to lactation stages with regard to ceruloplasmin to copper ratios.

Biol Trace Elem Res 146, 47-52.

Hussein, H.A., Staufenbiel, R. (2017):

Analytical validation of bovine plasma ceruloplasmin measurement by p- phenylenediamine oxidation and effect of storage time and freezing temperature.

Acta Vet Scand 59.

Ingenbleek, Y., Young, V. (1994):

Transthyretin (prealbumin) in health and disease- nutritional implications.

Annu Rev Nutr 14, 495-533.

Janciauskiene, S.M., Bals, R., Koczulla, R., Vogelmeier, C., Kohnlein, T., Welte, T. (2011):

The discovery of alpha 1- antitrypsin and its role in health and disease.

Respir Med 105, 1129-1139.

Jansen, E.H.J.M., Beekhof, P.K., Schenk, E. (2013):

Long- term stability of biomarkers of the iron status in human serum and plasma. Biomarkers 18, 365-368.

Jawor, P., Steiner, S., Stefaniak, T., Baumgartner, W., Rzasa, A. (2008):

Determination of selected acute phase proteins during the treatment of limb diseases in dairy cows.

Vet Med (Praha) 53, 173-183.

Jensen, L.E., Whitehead, A.S. (1998):

Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute- phase response. Biochem J 334, 489-503.

Jerome, H., Girault, M. (1969):

Estimation of ceruloplasmin. Standardization of results.

Ann Biol Clin (Paris) 27, 371-385.

Kabu, M., Elitok, B., Kucukkurt, I. (2016):

Detection of serum amyloid- A concentration in the calf clinically diagnosed with pneumonia, enteritis and pneumoenteritis.

Cienc Rural 46, 293-299.

Kajikawa, T., Furuta, A., Onishi, T., Tajima, T., Sugii, S. (1999):

Changes in concentrations of serum amyloid A protein, alpha(1)- acid glycoprotein, haptoglobin, and C- reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. Vet Immunol Immunopathol 68, 91-98.

Kaneko, J., J.; Harvey, J., W.; Bruss, M., L. (1997):

Appendix VIII: Blood analyte reference values in large animals.

In: Clinical biochemistry of domestic animals.

Academic press San Diego. pp. 890-894.

Kaya, S., Merhan, O., Kacar, C., Colak, A., Bozukluhan, K. (2016):

Determination of ceruloplasmin, some other acute phase proteins, and biochemical parameters in cows with endometritis.

Vet World 9, 1056-1062.

Kendall, N.R., Holmes-Pavord, H.R., Bone, P.A., Ander, E.L., Young, S.D. (2015): Liver copper concentrations in cull cattle in the UK: are cattle being copper loaded? Vet Rec 177, 493-497.

Khafipour, E., Krause, D.O., Plaizier, J.C. (2009):

A grain- based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation.

J Dairy Sci 92, 1060-1070.

Kincaid, R.L. (1999):

Assessment of trace mineral status of ruminants: a review.

Proceedings of the American Society of Animal Science.

Kincaid, R.L., Gay, C.C., Krieger, R.I. (1986):

Relationship of serum and plasma copper and ceruloplasmin concentrations of cattle and the effects of whole- blood sample storage.

Am J Vet Res 47, 1157-1159.

King, E.J., Campbell, D.M. (1961):

International enzyme units an attempt at international agreement.

Clin Chim Acta 6, 301-306.

Koets, A.P., de Schwartz, N., Tooten, P., Kankofer, M., Broekhuijsen-Davies, J.M., Taverne, M.A.M., van Leengoed, L.A.M.G., Taverne, M.A.M., Gruys, E. (1998):

Release of proinflammatory cytokines related to luteolysis and the periparturient acute phase response in prostaglandin- induced parturition in cows.

Theriogenology 49, 797-812.

Korman, J.D., Volenberg, I., Balko, J., Webster, J., Schiodt, F.V., Squires, R.H., Fontana, R.J., Lee, W.M., Schilsky, M.L., Failure, P.A.A.L. (2008):

Screening for Wilson disease in acute liver failure: a comparison of currently available diagnostic tests.

Hepatology 48, 1167-1174.

Kushner, I. (1982):

The phenomenon of the acute phase response.

Ann N Y Acad Sci 389, 39-48.

La Fontaine, S., Ackland, M.L., Mercer, J.F.B. (2010):

Mammalian copper- transporting P- type ATPases, ATP7A and ATP7B: emerging roles. Int J Biochem Cell Biol 42, 206-209.

La Fontaine, S., Mercer, J.F.B. (2007):

Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis. Arch Biochem Biophys 463, 149-167.

laboklin (2016):

Referenzwerte.

 $\frac{http://www.laboklin.de/pages/html/de/leistungsspektrum/referenzwerte/referenzwert\_hdktz.ht}{m}\ 10.09.2016\ 16:00.$ 

Lassila, R. (2016):

Platelet function tests in bleeding disorders.

Semin Thromb Hemost 42, 185-190.

Laven, R.A., Lawrence, K.E., Livesey, C.T. (2007):

The assessment of blood copper status in cattle: a comparison of measurements of caeruloplasmin and elemental copper in serum and plasma. N Z Vet J 55, 171-176.

Laven, R.A., Lawrence, K.E., Livesey, C.T. (2008):

An evaluation of the copper sequestrated during clotting in cattle: is it just caeruloplasmin? Vet J 176, 397-399.

Laven, R.A., Livesey, C.I., Offer, N.W., Fountain, D. (2004):

Apparent subclinical hepatopathy due to excess copper intake in lactating Holstein cattle. Vet Rec 155, 120-121.

Laven, R.A., Livesey, C.T. (2004):

The diagnosis of copper related disease: do we have the necessary tools? part 1: prevalence of disease and the diagnosis of copper toxicity. Cattle Pract 12, 265-269.

Laven, R.A., Livesey, C.T. (2005):

The diagnosis of copper related disease, part 2: copper responsive disorders. Cattle Pract 13, 55-60.

Laven, R.A., Livesey, C.T. (2006):

An evaluation of the effect of clotting and processing of blood samples on the recovery of copper from bovine blood.

Vet J 171, 295-300.

Laven, R.A., Livesey, C.T. (2007):

An evaluation of the effect of clotting on the relationship between copper and caeruloplasmin in bovine blood.

Vet J 174, 400-402.

Legleiter, L.R., Spears, J.W. (2007):

Plasma diamine oxidase: a biomarker of copper deficiency in the bovine. J Anim Sci 85, 2198-2204.

Legrand, D., Elass, E., Carpentier, M., Mazurier, J. (2005):

Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses.

Cell Mol Life Sci 62, 2549-2559.

Linder, M., C. (1991):

Biochemistry of Copper.

Biochemistry of the Elements, Springer, New York.

Linder, M.C., Hazegh-Azam, M. (1996):

Copper biochemistry and molecular biology.

Am J Clin Nutr 63, 797-811S.

Linder, M.C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R., Lomeli, N. (1998):

Copper transport.

Am J Clin Nutr 67, 965S-971S.

Lippi, G., Chance, J.J., Church, S., Dazzi, P., Fontana, R., Giavarina, D., Grankvist, K.,

Huisman, W., Kouri, T., Palicka, V., Plebani, M., Puro, V., Salvagno, G.L., Sandberg, S.,

Sikaris, K., Watson, I., Stankovic, A.K., Simundic, A.M. (2011):

Preanalytical quality improvement: from dream to reality.

Clin Chem Lab Med 49, 1113-1126.

Liu, N.M., Lo, L.S.L., Askary, S.H., Jones, L., Kidane, T.Z., Trang, T., Nguyen, M., Goforth,

J., Chu, Y.H., Vivas, E., Tsai, M., Westbrook, T., Linder, M.C. (2007):

Transcuprein is a macroglobulin regulated by copper and iron availability.

J Nutr Biochem 18, 597-608.

Livesey, C.I., Bidewell, C.A., Crawshaw, T.R., David, G.P. (2002):

Investigation of copper poisoning in cows by the veterinary laboratories agency.

Cattle Pract 10, 289-294.

Lomas, D.A. (2006):

The selective advantage of alpha(1)- antitrypsin deficiency.

Am J Respir Crit Care Med 173, 1072-1077.

Lopez-Alonso, M., Crespo, A., Miranda, M., Castillo, C., Hernandez, J., Benedito, J.L. (2006): Assessment of some blood parameters as potential markers of hepatic copper accumulation in cattle.

J Vet Diagn Invest 18, 71-75.

Lopez-Avila, V., Sharpe, O., Robinson, W.H. (2006):

Determination of ceruloplasmin in human serum by SEC-ICPMS.

Anal Bioanal Chem 386, 180-187.

Louro, M.O., Tutor, J.C., Paz, J.M. (1989):

Serum and plasma ceruloplasmin in humans.

J Clin Chem Clin Biochem 27, 511-513.

Lutsenko, S. (2010):

Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways.

Curr Opin Chem Biol 14, 211-217.

Lutsenko, S., Barnes, N.L., Bartee, M.Y., Dmitriev, O.Y. (2007):

Function and regulation of human copper- transporting ATPases.

Physiol Rev 87, 1011-1046.

Maas, J. (1987):

Relationship between nutrition and reproduction in beef- cattle.

Vet Clin North Am Food Anim Pract 3, 633-646.

MacIntyre, G., Gutfreund, K.S., Martin, W.R.W., Camicioli, R., Cox, D.W. (2004):

Value of an enzymatic assay for the determination of serum ceruloplasmin.

J Lab Clin Med 144, 294-301.

Mackenzie, A.M.I., D. V.; Jackson, D. W.; Telfer, S. B. (1996):

A comparison of methods of assessing copper and selenium status in cattle in the field.

In: Proceedings of the XIX WorldBiuatric Congress, Edingburgh. pp. 404-408.

Martinez-Subiela, S., Tecles, F., Ceron, J.J. (2007):

Comparison of two automated spectrophotometric methods for ceruloplasmin measurement in pigs.

Res Vet Sci 83, 12-19.

Martins, P.G.M.A., Moriel, P., Arthington, J.D. (2017):

Effects of storage temperature and repeated freeze- thaw cycles on stability of bovine plasma concentrations of haptoglobin and ceruloplasmin.

J Vet Diagn Invest 29, 738-740.

Mathew, G., Zwart, S.R., Smith, S.M. (2009):

Stability of blood analytes after storage in BD SST (TM) tubes for 12 mo.

Clin Biochem 42, 1732-1734.

Matthias, F., Kricke, W., Martin, K., Pfeil, W., Winter, R., Wörstenfeld, W. (2003):

Das große Tafelwerk interaktiv.

Cornelsen Verlag.

McDermott, J.A., Huber, C.T., Osaki, S., Frieden, E. (1968):

Role of iron in the oxidase activity of ceruloplasmin.

Biochim Biophys Acta 151, 541-557.

McDonald, T.L., Larson, M.A., Mack, D.R., Weber, A. (2001):

Elevated extrahepatic expression and secretion of mammary- associated serum amyloid A 3 (M-SAA3) into colostrum.

Vet Immunol Immunopathol 83, 203-211.

McMurray, C.H. (1980):

Copper deficiency in ruminants.

Ciba Found Symp 79, 183-207.

Medcalf, R.L. (2007):

Fibrinolysis, inflammation, and regulation of the plasminogen activating system.

J Thromb Haemost 5, 132-142.

Metz-Boutigue, M.H., Jolles, J., Mazurier, J., Schoentgen, F., Legrand, D., Spik, G., Montreuil, J., Jolles, P. (1984):

Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins.

Eur J Biochem 145, 659-676.

Mills, C.F. (1987):

Biochemical and physiological indicators of mineral status in animals: copper, cobalt and zinc.

J Anim Sci 65, 1702-1711.

Minatel, L., Carfagnini, J.C. (2002):

Evaluation of the diagnostic value of plasma copper levels in cattle.

Prev Vet Med 53, 1-5.

Morell, A.G., Windsor, J., Sternlieb, I., Scheinberg, I.H. (1968):

Measurement of the concentration of ceruloplasmin in serum by determination of its oxidase activity.

In: Sunderman SW, Sunderman SW Jr, eds Laboratory Diagnosis of Liver Diseases St Louis, MO: Warren H Green; 1968: 193–195 193-195.

Morimatsu, M., Syuto, B., Shimada, N., Fujinaga, T., Yamamoto, S., Saito, M., Naiki, M. (1991):

Isolation and characterization of bovine haptoglobin from acute phase sera.

J Biol Chem 266, 11833-11837.

Moshage, H. (1997):

Cytokines and the hepatic acute phase response.

J Pathol 181, 257-266.

Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. (2004):

Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet J 168, 28-40.

Naylor, J.M., Kasari, T.R., Blakley, B.R., Townsend, H.G.G. (1989):

Diagnosis of copper deficiency and effects of supplementation in beef cows.

Can Vet J 53, 343-348.

Nazifi, S., Esmailnezhad, Z., Haghkhah, M., Ghadirian, S., Mirzaei, A. (2012):

Acute phase response in lame cattle with interdigital dermatitis.

World J Microbiol Biotechnol 28, 1791-1796.

Nose, Y., Thiele, D.J. (2010):

Mechanism and regulation of intestinal copper absorption.

Genes Nutr 5, 11-14.

Nose, Y., Wood, L.K., Kim, B.E., Prohaska, J.R., Fry, R.S., Spears, J.W., Thiele, D.J. (2010): Ctr1 Is an apical copper transporter in mammalian intestinal epithelial cells in vivo that is controlled at the level of protein stability.

J Biol Chem 285, 32385-32392.

Nyasae, L., Bustos, R., Braiterman, L., Eipper, B., Hubbard, A. (2007):

Dynamics of endogenous ATP7A (Menkes protein) in intestinal epithelial cells: copperdependent redistribution between two intracellular sites.

Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 292, G1181-G1194.

Öhlschläger, S. (2006):

Mineralstoff-, Spurenelement- und Vitamingehalte im Blutserum bei erstlaktierenden Kühen (Deutsche Holstein) in Abhängigkeit von deren Versorgungsniveau.

In: Dissertation, Klinik für Rinder der Tierärztlichen Hochschule Hannover und dem Institut für Tierernährung der Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL) in Braunschweig Tierärztliche Hochschule Hannover.

Ostberg, J.R., Taylor, S.L., Baumann, H., Repasky, E.A. (2000):

Regulatory effects of fever- range whole- body hyperthermia on the LPS- induced acute inflammatory response.

J Leukoc Biol 68, 815-820.

Ouweltjes, W., de Zeeuw, A.C., Moen, A., Counotte, G.H. (2007):

Measurement of the status of trace elements in cattle using liver biopsy samples.

Tijdschr Diergeneeskd 132, 76-83.

Paltrinieri, S. (2008):

The feline acute phase reaction.

Vet J 177, 26-35.

Paynter, D.I. (1982):

Differences between serum and plasma ceruloplasmin activities and copper concentrations: investigation of possible contributing factors.

Aust J Biol Sci 35, 353-361.

Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H. (2004):

Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. Vet Res 35, 163-187.

pubchem (2017):

Bandrowski Base.

https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Bandrowski\_s\_base#section=Top 26.03.2017; 18:00Uhr.

Puls. R. (1988):

Mineral levels in animal health diagnostic data.

Sherpa International, Clearbrook, British Columbia.

Ramos, D., Mar, D., Ishida, M., Vargas, R., Gaite, M., Montgomery, A., Linder, M.C. (2016): Mechanism of copper uptake from blood plasma ceruloplasmin by mammalian cells. PLoS One 11, 1-23.

Ravin, H.A. (1961):

Improved colorimetric enzymatic assay of ceruloplasmin.

J Lab Clin Med 58, 161-168.

Reis, J.F., Madureira, K.M., Silva, C.P.C., Baldacim, V.P.A., Fagliari, J.J., Gomes, V. (2016): Serum protein profile of Holstein cows during the transition period.

Arg Bras Med Vet Zootec 68, 587-595.

Rice, E.W. (1960):

Correlation between serum copper, ceruloplasmin activity and C-reactive protein.

Clin Chim Acta 5, 632-636.

Rice, E.W. (1962a):

Standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme units.

Fed Proc 21, 228-232.

Rice, E.W. (1962b):

Standardization of ceruloplasmin activity in terms of international enzyme units - oxidative formation of Bandrowskis base from P- phenylenediamine by ceruloplasmin.

Anal Biochem 3, 452-456.

Roberts, E.A., Sarkar, B. (2008):

Liver as a key organ in the supply, storage, and excretion of copper.

Am J Clin Nutr 88, 851s-854s.

Rogers, P., A., M. (1996):

Trace element supplementation of cows.

In: Proceedings of the XIX World Biuatric Congress. Edingburgh. pp. 394-396.

Rossbacher, J., Wagner, L., Pasternack, M.S. (1999):

Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity.

Scand J Immunol 50, 399-404.

Rossow, N.B., G. (1994):

Referenzbereiche wichtiger Laborwerte.

In: Stoffwechselstörungen bei Haustieren.

Gustav Fischer Verlag Jena. pp. 191.

Ryan, T.P., Grover, T.A., Aust, S.D. (1992):

Rat ceruloplasmin - resistance to proteolysis and kinetic comparison with human ceruloplasmin.

Arch Biochem Biophys 293, 1-8.

Ryden, L. (1972):

Comparison of polypeptide- chain structure of 4 mammalian ceruloplasmins by gel- filtration in guanidine hydrochloride solutions.

Eur J Biochem 28, 46-50.

Sarnat-Kucharczyk, M., Rokicki, W., Zalejska-Fiolka, J., Pojda-Wilczek, D., Mrukwa-Kominek, E. (2016):

Determination of serum ceruloplasmin concentration in patients with primary open angle glaucoma with cataract and patients with cataract only: a pilot study.

Med Sci Monit 22, 1384-1388.

Schosinsky, K.H., Lehmann, H.P., Beeler, M.F. (1974):

Measurement of ceruloplasmin from its oxidase activity in serum by use of ortho-dianisidine dihydrochloride.

Clin Chem 20, 1556-1563.

Scott, K.C., Turnlund, J.R. (1994):

Compartmental model of copper- metabolism in adult men.

J Nutr Biochem 5, 342-350.

Seppa-Lassila, L., Orro, T., Lassen, B., Lasonen, R., Autio, T., Pelkonen, S., Soveri, T. (2015):

Intestinal pathogens, diarrhoea and acute phase proteins in naturally infected dairy calves. Comp Immunol Microbiol Infect Dis 41, 10-16.

Simundic, A.M., Lippi, G. (2012):

Preanalytical phase- a continuous challenge for laboratory professionals.

Biochem Med (Zagreb) 22, 145-149.

Sinclair, L.A., Atkins, N.E. (2015):

Intake of selected minerals on commercial dairy herds in central and northern England in comparison with requirements.

J Agric Sci 153, 743-752.

Smart, M.E., Cymbaluk, N.F., Christensen, D.A. (1992):

A review of copper status of cattle in canada and recommendations for supplementation. Can Vet J 33, 163-170.

Smith, B., Coup, M.R. (1973):

Hypocuprosis: a clinical investigation of dairy herds in Northland.

N Z Vet J 21, 252-258.

Smith, B.S.W., Wright, H. (1974):

Improved manual and automated procedures for estimation of ceruloplasmin oxidase activity. Clin Chim Acta 50, 359-366.

Smith, S.L., Grace, N.D., West, D.M., Balemi, S.C. (2010):

The impact of high zinc intake on the copper status of dairy cows in New Zealand. N Z Vet J 58, 142-145.

Solter, P.F., Hoffmann, W.E., Hungerford, L.L., Siegel, J.P., Stdenis, S.H., Dorner, J.L. (1991):

Haptoglobin and Ceruloplasmin as Determinants of Inflammation in Dogs.

Am J Vet Res 52, 1738-1742.

Spolders, M., Holtershinken, M., Meyer, U., Rehage, J., Flachowsky, G. (2010):

Assessment of reference values for copper and zinc in blood serum of first and second lactating dairy cows.

Vet Med Int 2010, 1-8.

Steffl, M., Leberl, P., Schenkel, H., Amselgruber, W.M. (2009):

Iron- induced copper deficiency in dairy cows.

Tierarztl Umsch 64, 432-437.

Sunderman, F.W., Jr., Nomoto, S. (1970):

Measurement of human serum ceruloplasmin by its p- phenylenediamine oxidase activity. Clin Chem 16, 903-910.

Suttle, N. (1993):

Overestimation of copper deficiency.

Vet Rec 133, 123-124.

Suttle, N.F. (1991):

The Interactions between copper, molybdenum, and sulfur in ruminant nutrition. Annu Rev Nutr 11, 121-140.

Suttle, N.F. (2008):

Relationships between the concentrations of trichloroacetic acid- soluble copper and caeruloplasmin in the serum of cattle from areas with different soil concentrations of molybdenum.

Vet Rec 162, 237-240.

Suttle, N.F. (2010):

Mineral Nutrition of Livestock, 4th Edition.

CABI, Wallingford, Oxfordshire.

Suttle, N.F., Angus, K.W. (1976):

Experimental copper deficiency in the calf.

J Comp Pathol 86, 595-608.

Szczubial, M., Dbrowski, R., Kankofer, M., Bochniarz, M., Komar, M. (2012): Concentration of serum amyloid A and ceruloplasmin activity in milk from cows with subclinical mastitis caused by different, pathogens. Pol J Vet Sci 15, 291-296.

Tadich, N., Tejeda, C., Bastias, S., Rosenfeld, C., Green, L.E. (2013): Nociceptive threshold, blood constituents and physiological values in 213 cows with locomotion scores ranging from normal to severely lame. Vet J 197, 401-405.

Tapiero, H., Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003):

Trace elements in human physiology and pathology. Copper.

Biomed Pharmacother 57, 386-398.

Telfer, S.B., Mackenzie, A.M., Illingworth, D.V., Jackson, D.W. (1996):

The use of ceruloplasmin activities and plasma copper concentrations as indicators of copper status in cattle.

In: World Buiatrics Conference, Conference, P.o.t.W.B. (ed). Proceedings of the World Buiatrics Conference, Edinburgh. pp. 402-403.

Terada, K., Kawarada, Y., Miura, N., Yasui, O., Koyama, K., Sugiyama, T. (1995): Copper incorporation into ceruloplasmin in rat livers. Bba-Mol Basis Dis 1270, 58-62.

Thomas, F.C., Waterston, M., Hastie, P., Parkin, T., Haining, H., Eckersall, P.D. (2015): The major acute phase proteins of bovine milk in a commercial dairy herd. BMC Vet Res 11.

Tothova, C., Nagy, O., Kovac, G. (2014):

Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. Vet Med (Praha) 59, 163-180.

Tothova, C., Nagy, O., Nagyova, V., Kovac, G. (2015):

Changes in the concentrations of acute phase proteins in calves during the first month of life. Acta Vet (Beogr) 65, 260-270.

Tothova, C.S., Nagy, O., Seidel, H., Konvicna, J., Farkasova, Z., Kovac, G. (2008):

Acute phase proteins and variables of protein metabolism in dairy cows during the pre- and postpartal period.

Acta Vet (Brno) 77, 51-57.

Trevisi, E., Amadori, M., Bakudila, A.M., Bertoni, G. (2009):

Metabolic changes in dairy cows induced by oral, low- dose interferon- alpha treatment. J Anim Sci 87, 3020-3029.

Trevisi, E., Amadori, M., Cogrossi, S., Razzuoli, E., Bertoni, G. (2012):

Metabolic stress and inflammatory response in high- yielding, periparturient dairy cows. Res Vet Sci 93, 695-704.

Uchida, E., Katoh, N., Takahashi, K. (1993):

Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition.

J Vet Med Sci 55, 893-894.

Uhlar, C.M., Burgess, C.J., Sharp, P.M., Whitehead, A.S. (1994):

Evolution of the serum amyloid-a (SAA) protein superfamily.

Genomics 19, 228-235.

Underwood, E.J., Suttle, N.F. (1999):

The mineral nutrition of livestock. (3. edn)

CABI Publ., Wallingford u.a.

van Altena, S.E.C., de Klerk, B., Hettinga, K.A., van Neerven, R.J.J., Boeren, S., Savelkoul, H.F.J., Tijhaar, E.J. (2016):

A proteomics- based identification of putative biomarkers for disease in bovine milk.

Vet Immunol Immunopathol 174, 11-18.

Vashchenko, G., MacGillivray, R.T.A. (2013):

Multi- copper oxidases and human iron metabolism.

Nutrients 5, 2289-2313.

Vermunt, J.J., West, D.M. (1994):

Predicting copper status in beef- cattle using serum copper concentrations.

N Z Vet J 42, 194-195.

vetmed.uni-Leipzig (2016):

Referenzwerte.

http://www.vetmed.uni-leipzig.de/ik/wmedizin/labor/diagnostik/referenzwerte/rind.htm 10.09.2016 16:23.

Walker, F.J., Fay, P.J. (1990):

Characterization of an interaction between protein- C and ceruloplasmin.

J Biol Chem 265, 1834-1836.

Wang, H., Li, D., Wu, Z.Y., Shen, G.L., Yu, R.Q. (2004):

A reusable piezo- immunosensor with amplified sensitivity for ceruloplasmin based on plasma- polymerized film.

Talanta 62, 201-208.

Ward, J.D., Spears, J.W. (1999):

The effects of low- copper diets with or without supplemental molybdenum on specific immune responses of stressed cattle.

J Anim Sci 77, 230-237.

Ward, P.P., Uribe-Luna, S., Conneely, O.M. (2002):

Lactoferrin and host defense.

Biochem Cell Biol 80, 95-102.

Weber, A., Weber, A.T., McDonald, T.L., Larson, M.A. (2006):

Staphylococcus aureus lipotechoic acid induces differential expression of bovine serum amyloid A3 (SAA3) by mammary epithelial cells: implications for early diagnosis of mastitis. Vet Immunol Immunopathol 109, 79-83.

Weiss, K.H., Wurz, J., Gotthardt, D., Merle, U., Stremmel, W., Fullekrug, J. (2008): Localization of the Wilson disease protein in murine intestine. J Anat 213, 232-240.

Wikse, S.E., Herd, D., Field, R., Holland, P. (1992): Diagnosis of copper deficiency in cattle. J Am Vet Med Assoc 200, 1625-1629.

Winkles, J., Jones, A.F., Winyard, P., Blake, D.R., Lunec, J. (1988): An automated- method for the kinetic measurement of ferroxidase activity. Ann Clin Biochem 25, 250-254.

Wolf, P.L. (1982):

Ceruloplasmin- methods and clinical use.

Crit Rev Clin Lab Sci 17, 229-245.

Yanagimoto, C., Harada, M., Kumemura, H., Abe, M., Koga, H., Sakata, M., Kawaguchi, T., Terada, K., Hanada, S., Taniguchi, E., Ninomiya, H., Ueno, T., Sugiyama, T., Sata, M. (2011):

Copper incorporation into ceruloplasmin is regulated by Niemann- Pick C1 protein. Hepatol Res 41, 484-491.

Yanagimoto, C., Haradaa, M., Kumemura, H., Koga, H., Kawaguchi, T., Terada, K., Hanada, S., Taniguchi, E., Koizumi, Y., Koyota, S., Ninomiya, H., Ueno, T., Sugiyama, T., Sata, M. (2009):

Niemann- Pick C1 protein transports copper to the secretory compartment from late endosomes where ATP7B resides.

Exp Cell Res 315, 119-126.

Yang, F.M., Haile, D.J., Berger, F.G., Herbert, D.C., Van Beveren, E., Ghio, A.J. (2003): Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284, L402-L409.

Yoshioka, M., Watanabe, A., Shimada, N., Murata, H., Yokomizo, Y., Nakajima, Y. (2002): Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes.

Domest Anim Endocrinol 23, 425-433.

Young, S.N., Curzon, G. (1972):

A method for obtaining linear reciprocal plots with caeruloplasmin and its application in a study of the kinetic parameters of caeruloplasmin substrates. Biochem J 129, 273-283.

Zhang, G.S., Hailemariam, D., Dervishi, E., Goldansaz, S.A., Deng, Q.L., Dunn, S.M., Ametaj, B.N. (2016):

Dairy cows affected by ketosis show alterations in innate immunity and lipid and carbohydrate metabolism during the dry off period and postpartum. Res Vet Sci 107, 246-256.

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Kupferhaltige Enzyme	5
Tabelle 2: Referenzbereiche für die Kupferkonzentration im Blut in µmol/ I	20
Tabelle 3: Referenzbereiche für Ceruloplasmin im Blut	22
Tabelle 4: Referenzbereiche für die Leberkupferkonzentration in mg/ kg TM	23
Tabelle 5: Referenzbereiche für die Kupferkonzentration in der Niere in mg/ kg TM	23
Tabelle 6: Referenzwerte für die Kupferkonzentration im Haar in mg/ kg TM	24
Tabelle 7: Korrelationskoeffizienten verschiedener Messgrößen in unterschiedlichen Medi	ien
Tabelle 8: Untersuchungsgruppen	31
Tabelle 9: Probengefäße	
Tabelle 10: Verwendete Chemikalien	
Tabelle 11: Ablauf der manuellen Messung	35
Tabelle 12: Ablauf der automatisierten Messung (Cobas Mira)	
Tabelle 13: Vergleich der manuellen und automatischen Methode	
Tabelle 14: Berechnung des theoretischen Faktors	39
Tabelle 15: Gleichungen zum Verlauf der Kontrollen der automatischen Messung, nach	
Zeitraum	
Tabelle 16: Präzision in der Serie aus der manuellen Messung (n= 10, MW± SD in mg/ l).	
Tabelle 17: Präzision in der Serie aus der automatischen Messung (n= 10, MW± SD in mo	•
Tabelle 18: Präzision von Tag zu Tag (MW± SD in mg/ I) (17.0219.10.2015)	50
Tabelle 19: Präzision von Tag zu Tag nach Etablierung der Methode, automatische	
Messung, (n= 10, MW± SD in mg/ I)	50
Tabelle 20: Vergleich der unverdünnten Probe mit der 1:1 bzw. 1:3 mit Aqua dest.	
verdünnten Probe (n=10; in mg/ l)	51
Tabelle 21: Vergleich der unverdünnten Probe mit der 1:1 bzw. 1:3 mit NaCl verdünnten	
Probe (n=10; in mg/ l)	
Tabelle 22: Gegenüberstellung der Verdünnungen mit Aqua dest. und NaCl- Lösung (n=1	
Tabelle 23: Regressionsgleichungen zu den Verdünnungspaaren (n= 10)	53
Tabelle 24: Gegenüberstellung von 1:1 mit Aqua dest. und NaCl- Lösung unterschiedliche	∍r
Konzentration verdünnter Proben (n= 6; in mg/ I)	
Tabelle 25: Regressionsgleichungen zu den Verdünnungsreihen aus Tabelle 24	55
Tabelle 26: Cp- Messwerte aus der Lagerung bei Raumtemperatur (n= 10, in mg/ I)	
Tabelle 27: Cp- Messwerte aus der Lagerung im Kühlschrank (n= 10, in mg/ l)	59
Tabelle 28: rechnerischer Verlust der Cp- Konzentration verschiedener Proben bei Lageru	ung
für 30 Tage bei -20°C	
Tabelle 29: Cp- Messwerte aus der Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus (n= 10, in mg/ l)	66
Tabelle 30: Parameter aus den Messungen der Betriebe mit der manuellen Methode (Cp-	,
Konzentration in mg/ I)	71

### Tabellenverzeichnis

Tabelle 31: Parameter aus den Messungen der Betriebe mit der automatischen Methode	
(Cp- Konzentration in mg/ I)74	ļ
Tabelle 32: Pearson- Korrelationen verschiedener Wertepaare aus den Messungen der Betriebe	õ
Tabelle 33: Gesamtwerte der mit der manuellen und automatischen Methode bestimmten	
Cp- Konzentrationen der Betriebe (in mg/ I)78	3
Tabelle 34: errechnete Korrekturfaktoren aus den Ergebnissen der Kontrollmessungen mit	
der manuellen und automatischen Methode (17.0219.10.2015)80	)
Tabelle 35: errechnete Korrekturfaktoren aus den Ergebnissen der Betriebsmessungen mit	
der manuellen und automatischen Methode83	3
Tabelle 36: statistische Größen zur Bland- Altman- Analyse der Kontrollproben (MW	
Differenz (_am) in mg/ I)84	ļ
Tabelle 37: statistische Größen zur Bland- Altman- Analyse der Betriebsproben (MW	
Differenz (_am) in mg/ I)	ŝ
Tabelle 38: 95 %- Konfidenzintervalle der Mittelwerte der Differenzen aus den Bland-	
Altman- Analysen der Kontroll- und Betriebsmessungen (in mg/ I)	3
Tabelle 39: Gegenüberstellung der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der	
Betriebsmessungen, jeweils für das manuelle und automatische Messverfahren (Serum/	
Plasma in mg/ l± SD)88	3
Tabelle 40: Gegenüberstellung der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der	
Messungen des Lagerungsversuches (Serum/ Plasma in mg/ l± SD; n=10)	)
Tabelle 41: Korrelationskoeffizienten nach Pearson aus den Mittelwerten der	
Einzelmessungen der Betriebe und den entsprechenden Poolproben	L
Tabelle 42: Korrelationskoeffizienten nach Pearson aus den Mittelwerten der	
Einzelmessungen der Betriebe und den entsprechenden Poolproben, nach Etablierung der	
Methode (n= 21 Betriebe)	<u>-</u>
Tabelle 43: Beispiele für im Durchlauf ansteigende Cp- Konzentrationen der Kontrollwerte	,
(in mg/ I), Serum- und Plasmawerte wurden parallel bestimmt; automatische Messung 97 Tabelle 44: Beispiel für in den Serumproben stabile und den parallel gemessenen	,
Plasmaproben steigende Cp- Konzentrationen der Kontrollen (in mg/ I); automatische	
Messung	7
Tabelle 45: Beispiel für im Durchlauf fallende Cp- Konzentrationen der Kontrollwerte	
(in mg/ I), Serum- und Plasmawerte wurden parallel bestimmt; automatische Messung 98	3
Tabelle 46: Beispiele für deutliche Ausreißer der ermittelten Cp- Konzentrationen in den	
Kontrollwerten (in mg/ I), Serum- und Plasmawerte wurden parallel bestimmt; automatische	
Messung	
Tabelle 47: intra- und interday- Variationskoeffizienten verschiedener Autoren 100	
Tabelle 48: prozentualer Verlust an Ceruloplasmin im Jahresverlauf106	ò
Tabelle 49: Wichtige Größen der Bland- Altman- Analyse der Betriebswerte (Analyse über die Werte aller Betriebe und separat nach Laktationsgruppen) (Mittelwerte der Differenzen	
in mg/ l)110	)
Tabelle 50: Beispiele für deutliche Differenzen zwischen den mit der manuellen und	
automatischen Methode bestimmten Konzentrationen der Proben einiger Betriebe (in mg/ l)	
	)

### Tabellenverzeichnis

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Tagesmittelwerte der mit der manuellen Methode gemessenen Kontrollprobe	
Abbildung 2: Verbliebene Kontrollwerte aus der manuellen Messung	
Abbildung 3: Verbliebene Kontrollwerte aus der automatischen Messung	
Abbildung 4: Verlauf der automatischen Kontrollen vom 17.0207.05.2015	
Abbildung 5: Verlauf der automatischen Kontrollen vom 17.0603.12.2015	
Abbildung 6: Regressionsgerade der Werte der unverdünnten und der zur Hälfte mit Aqua	
dest. verdünnten Proben	
Abbildung 7: Regressionsgerade der Werte der unverdünnten und der zur Hälfte mit NaCl	
Lösung verdünnten Proben	
Abbildung 8: Abhängigkeit der Regressionskoeffizienten aus Tabelle 25 von den	
Konzentrationen der zur Verdünnung verwendeten NaCl- Lösung	. 56
Abbildung 9: Verlauf der Serumwerte bei Lagerung bei Raumtemperatur	
Abbildung 10: Verlauf der Plasmawerte bei Lagerung bei Raumtemperatur	
Abbildung 11: Vergleich der Serum- und Plasmawerte der bei Raumtemperatur gelagerter	
Proben	
Abbildung 12: Verlauf der Serumwerte bei Lagerung im Kühlschrank	
Abbildung 13: Verlauf der Plasmawerte bei Lagerung im Kühlschrank	
Abbildung 14: Vergleich der Serum- und Plasmawerte der im Kühlschrank gelagerten Pro	
Abblidding 14. Vergleich der Gerun- und Flasmawerte der im Rumschlank gelagerten Fol	
Abbildung 15: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der manuellen Methode	. 01
bestimmten Serumkontrollproben (Lagerung bei -20°C)	. 62
Abbildung 16: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der manuellen Methode	
bestimmten Plasmakontrollproben (Lagerung bei -20°C)	62
Abbildung 17: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der automatischen Methode	
bestimmten Serumkontrollproben (Lagerung bei -20°C)	
Abbildung 18: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der mit der automatischen Methode	
bestimmten Plasmakontrollproben (Lagerung bei -20°C)	
Abbildung 19: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der nach der Etablierung der	
automatischen Methode bestimmten Serumkontrollproben (Lagerung bei -20°C)	65
Abbildung 20: Verlauf der Ceruloplasminkonzentration der nach der Etablierung der	
automatischen Methode bestimmten Plasmakontrollproben (Lagerung bei -20°C)	65
Abbildung 21: Verlauf der Serumwerte bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus	
Abbildung 22: Verlauf der Plasmawerte bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus	
Abbildung 23: Vergleich der Serum- und Plasmawerte bei Lagerung mit Einfrier-	
Auftauzyklus	68
Abbildung 24: Vergleich der Serumproben bei Lagerung bei Raumtemperatur und im	
Kühlschrank	68
Abbildung 25: Vergleich der Plasmaproben bei Lagerung bei Raumtemperatur und im	
Kühlschrank	69
Abbildung 26: Vergleich der Serumproben bei Lagerung bei Raumtemperatur, im	
Kühlschrank und bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzvklus	. 70

Abbildung 27: Vergleich der Plasmaproben bei Lagerung bei Raumtemperatur, im
Kühlschrank und bei Lagerung mit Einfrier- Auftauzyklus
Abbildung 28: Mittelwerte der Cp- Konzentration in Serumproben nach Laktationsgruppen
aus den Messungen der Betriebe mit der manuellen Methode
Abbildung 29: Mittelwerte der Cp- Konzentration in Plasmaproben nach Laktationsgruppen
aus den Messungen der Betriebe mit der manuellen Methode
Abbildung 30: Vergleich der Mittelwerte der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der
mit der manuellen Methode gemessenen Proben der Betriebe nach Laktationsgruppen 73
Abbildung 31: Mittelwerte der Cp- Konzentration in Serumproben nach Laktationsgruppen
aus den Messungen der Betriebe mit der automatischen Methode74
Abbildung 32: Mittelwerte der Cp- Konzentration in Plasmaproben nach Laktationsgruppen
aus den Messungen der Betriebe mit der automatischen Methode74
Abbildung 33: Vergleich der Mittelwerte der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der
mit der automatischen Methode gemessenen Proben der Betriebe nach Laktationsgruppen75
Abbildung 34: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und
automatischen Methode bestimmten Serumwerte der Betriebsmessungen (n= 155)
Abbildung 35: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und
automatischen Methode bestimmten Serumwerte der Betriebsmessungen – mit Schnittpunkt
Nullpunkt (n= 155)
Abbildung 36: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und
automatischen Methode bestimmten Plasmawerte der Betriebsmessungen (n= 153)
Abbildung 37: Regressionsanalyse aus der Gegenüberstellung der mit der manuellen und
automatischen Methode bestimmten Plasmawerte der Betriebsmessungen – mit
Schnittpunkt Nullpunkt (n= 153)
Abbildung 38: Vergleich der Verläufe der parallel mit der manuellen und automatischen
Methode bestimmten Kontrollproben (ohne Faktor)
Abbildung 39: Vergleich der Verläufe der parallel mit der manuellen und automatischen
Methode bestimmten Kontrollproben (mit Faktor geteilt)
Abbildung 40: Vergleich der Verläufe der parallel mit der manuellen und automatischen
Methode bestimmten Kontrollproben (mit Gesamtfaktor)
Abbildung 41: Bland- Altman- Grafik der Serumkontrollen
Abbildung 42: Bland- Altman- Grafik der Plasmakontrollen
Abbildung 43: Bland- Altman- Grafik der Serumwerte der Betriebsmessungen, ohne Faktor85
Abbildung 44: Bland- Altman- Grafik der Plasmawerte der Betriebsmessungen, ohne Faktor
Abbildung 45: Histogramm mit Normalverteilungskurve der Differenzen der Serumwerte aus
den Betriebsmessungen
Abbildung 46: Q- Q- Diagramm der Differenzen der Serumwerte aus den
Betriebsmessungen
Abbildung 47: Histogramm mit Normalverteilungskurve der Differenzen der Plasmawerte aus
den Betriebsmessungen
Abbildung 48: Q- Q- Diagramm der Differenzen der Plasmawerte aus den
Betriebsmessungen
Abbildung 49: Bland- Altman- Grafik der Serumwerte der Betriebsmessungen nach
Anpassung mit dem Korrekturfaktor 1,30
Anipassung init deni Noriektunaktor 1,50 8/

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 50: Bland- Altman- Grafik der Plasmawerte der Betriebsmessungen nach
Anpassung mit dem Korrekturfaktor 1,35 87
Abbildung 51: Vergleich der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der
Betriebsmessungen; bestimmt mit der manuellen Methode (n= 145) 89
Abbildung 52: Vergleich der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der
Betriebsmessungen; bestimmt mit der manuellen Methode (n= 145) – mit Schnittpunkt
Nullpunkt89
Abbildung 53: Vergleich der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der
Betriebsmessungen; bestimmt mit der automatischen Methode (n= 145) 89
Abbildung 54: Vergleich der Cp- Konzentrationen in Serum und Plasma der
Betriebsmessungen; bestimmt mit der automatischen Methode (n= 145) – mit Schnittpunkt
Nullpunkt
Abbildung 55: Regressionsgerade aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe
und den entsprechenden Poolproben91
Abbildung 56: Regressionsgerade aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe
und den entsprechenden Poolproben, unter Berücksichtigung der Lagerungsdauer 91
Abbildung 57: Regressionsgerade aus den Mittelwerten der Einzelmessungen der Betriebe
und den entsprechenden Poolproben, nach Etablierung der Methode92
Abbildung 58: Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der manuellen Methode bestimmten
Proben der Betriebsmessungen, unter Berücksichtigung des zeitlichen Abstandes zwischen
dem Probennahmetag und dem Messtag (n= 141) 113
Abbildung 59: Quotienten aus Plasma/ Serum der mit der automatischen Methode
bestimmten Proben der Betriebsmessungen, unter Berücksichtigung des zeitlichen
Abstandes zwischen dem Probennahmetag und dem Messtag (n= 141) 113

## **Anhang**

Tabelle 54: Übersicht über einige verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Cobas Mira	Roche Cobas Mira Plus
Eppendorf- Zentrifuge	Eppendorf Zentrifuge 5415C
Küvetten Photometer	Greiner bio- one CUVETTES 10x10x45 SEMI MICRO
Parafilm	BEMIS Parafilm "M"
pH- Meter	Inolap pH Level 2P Wissenschaftlich Technische Werkstätten 82362 Weilheim
Photometer	Dr. Lange LP700
Pipettenspitzen	Sarstedt Ag D- 51588 Sartstedt
Reaktionsröhrchen	5ml 75x12mm PS D- 51588 Sartstedt
Vortex	Heidolph REAX 2000
Waage	Sartorius Ag Göttingen
Wärmeplatte	IKAMAG RCT
Zentrifugen	Hettich Zentrifuge Universal 320R

Tabelle 55: Vergleich verschiedener Methoden zur Ceruloplasminbestimmung; modifiziert nach Sunderman und Nomoto (1970)

	1	2	3	4	5	6ª	6 <sup>b</sup>	7	8	9	_m	_a
Substrat	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> PPD- 2HCL	PPD	PPD- 2HCL	PPD- 2HCL	PPD oder PPD- 2HCL	PPD- 2HCL	PPD- 2HCL	PPD	PPD- 2HCL	PPD	PPD- 2HCL	PPD- 2HCL
Substratkonzentration im Reaktionsgemisch mmol/ I	1,66	8,41	4,45	3,04	8,54	7,36	7,72	11,4	18,4	2,31	8,92	8,58
pH Acetat- Puffer	6,0	5,2	6,0	5,5	5,2	5,65	5,65	5,2	5,12	5,6	5,45	5,45
Konzentration Acetat- Puffer im Reaktionsgemisch mol/ I	0,66	1,09	0,097	0,35	1,09	0,4	0,43	0,92	0,27	0,14	0,097	0,093
Serumverdünnung im Reaktionsgemisch	1:17,5	1:11	1:31	1:91	1:11	1:15	1:51	1:13	1:3	1:20	1:31	1:15
Konzentration CI- im Reaktionsgemisch mmol/ I <sup>c</sup>	9	9	12	7	9 oder 26	21	17	8	127	10	21	24
Inkubationstemperatur in°C	Umgebungs- temperatur	37	37	37	37	37	37	30	30	37	37	37
Inkubationsdauer min	6	15	30	60	15	3	15	6	5	40	30	15,8
Verneiden der Verzögerungsphase	Ja	Nein	Ja	Nicht benötigt	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
Compensation der nicht- enzymatischen oxidation des Serums	EDTA	Nein	NaN₃ LW	NaN <sub>3</sub> LW	EDTA	Nein	NaN₃ LW	Nein	Korrekturfaktor	EDTA	NaN <sub>3</sub> LW	Ja
Spektrophotometriewellenlänge nm	522	525	530	530	540	546	546	530	530	545	534	550
Ceruloplasmineinheiten	dOD/ min/ dl	mg/ dl	dOD/ 0,5h/	mg/ dl	IU/ I	mg/ dl	mg/ dl	mg/ dl	mg/ dl	mg/ dl	mg/ I	mg/ l

LW: Leerwert; a: Kinetische Methode; b: Zwei- Punkt- Methode; c: unter der Annahme einer Chloridkonzentration von 100 mmol/ I \_a: hier, automatische Methode

2: (Houchin 1958)

6: (Colombo & Richterich 1964) 7: (Cox 1966) 8: (Morell et al. 1968) 9: (Jerome & Girault 1969)

\_m: hier, manuelle Methode

1: (Humoller et al. 1958)

3: (Henry et al. 1960) 4: (Ravin 1961)

5: (Rice 1962a)

### **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen bedanken, die mir bei der Erstellung dieser Arbeit behilflich waren.

Für die Überlassung des Themas und die ausgezeichnete Betreuung gilt mein ganz besonderer Dank Herrn Univ.- Prof. Dr. R. Staufenbiel. Jederzeit ansprechbar und immer freundlich hat er durch die richtigen Hinweise und Anregungen eine zielführende Bearbeitung des Themas ermöglicht.

Für die unermüdliche Probensammlung und unterhaltsamen Ausfahrten möchte ich mich bei Andrea Roder bedanken.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Mitarbeitern des Labors der Klauentierklinik, insbesondere bei Michaela Waberowski und Herrn Dr. Hilmert, die mich durch ihre Unterstützung bei den zahlreichen Problemen nicht verzweifeln ließen.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Laura Pieper und Dr. Todd Grande.

Auch wenn oder gerade weil sie selbstverständlich sowieso immer für mich da sind, möchte ich mich noch einmal explizit bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Vielen Dank besonders an Mausi, Mutti, Omi, Uli und Jane!

Zudem danke ich den Betrieben für die Bereitstellung der Probandinnen.

## Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.05.2019

Gerd Gunther Hänske