



Aus der Klinik für Klautiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin

**Untersuchungen zu den Veränderungen im weißen Blutbild
von Holstein Friesian Milchkühen 14 Tage ante partum bis
100 Tage post partum in Beziehung zur Futteraufnahme und
ausgewählten Erkrankungen**

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

vorgelegt von
Rudi Barthmann
Tierarzt aus Marienberg

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4183

**Aus der Klinik für Klautiere
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

**Untersuchungen zu den Veränderungen im weißen Blutbild von Holstein Friesian
Milchkühen 14 Tage ante partum bis 100 Tage post partum in Beziehung zur
Futteraufnahme und ausgewählten Erkrankungen**

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

**vorgelegt von
Rudi Barthmann
Tierarzt
aus Marienberg**

Berlin 2020

Journal-Nr.: 4183

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. Robert Klopffleisch
Dritter Gutachter:	Dr. med. vet. Carola Fischer-Tenhagen

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): holstein friesland, dairy cows, feed intake, animal nutrition, feeding, pregnancy, puerperium, blood analysis, foot diseases, stillbirths, mastitis, metabolic disorders, reproductive disorders

Tag der Promotion: 24.06.2020

Meiner Familie

Inhalt

Inhalt	I
Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
2 Literatur	3
2.1 Früherkennung von Krankheiten	3
2.1.1 Kondition	3
2.1.2 Stoffwechselfparameter	4
2.2 Entzündungsgeschehen bei Milchkühen	5
2.2.1 Zytokine	5
2.2.2 Akute-Phase-Proteine	8
2.3 Leukozyten	8
2.3.1 Historische Entwicklung	10
2.3.2 Referenzwerte in den letzten 80 Jahren	12
2.3.3 Einflussfaktoren auf das Differentialblutbild	12
2.3.4 Gesamtleukozytenanzahl	14
2.3.5 Differentialblutbild	22
2.3.6 Interpretation der WBC und des Differentialblutbildes	28
2.3.7 Laktationsdynamik der Leukozyten	32
3 Material und Methoden	34
3.1 Allgemeines	34
3.1.1 Untersuchungsbetrieb und Management	34
3.1.2 Fütterung	37
3.1.3 Auswahl der Probandenkühe	37
3.1.4 Von den Untersuchungen ausgeschlossene Rinder	37
3.2 Probenschema und Probengewinnung	38
3.2.1 Futtermittelaufnahme	38

3.2.2	Herdendaten	38
3.2.3	Pansenfüllung	38
3.2.4	Allgemeinuntersuchung.....	39
3.2.5	Diagnosen.....	39
3.2.6	Blutproben.....	40
3.3	Probenanalyse	41
3.4	Statistik	44
3.4.1	Gemischte Modelle	44
3.4.2	Referenzwerte.....	46
3.4.3	Korrelationen.....	46
3.4.4	Regressionsanalyse, Mann-Whitney-U- und t-Test	47
3.4.5	Variationskoeffizient	47
4	Ergebnisse	49
4.1	Methodischer Fehler.....	49
4.1.1	Interday – und Intraday – Variationskoeffizienten in einem Präparat	49
4.1.2	Intra- und Interday Variationskoeffizienten	50
4.1.3	Intraday – Variationskoeffizienten in zehn verschiedenen Präparaten.....	53
4.2	Laktationsverlauf	55
4.2.1	WBC	55
4.2.2	Lymphozyten.....	56
4.2.3	Monozyten	58
4.2.4	Segmentkernige Granulozyten	60
4.2.5	Stabkernige Granulozyten	62
4.2.6	Eosinophile Granulozyten	64
4.2.7	Basophile Granulozyten	66
4.2.8	Juvenile Granulozyten.....	66
4.3	Ableitung von Referenzwerten	67
4.3.1	WBC zu den jeweiligen Beprobungstagen.....	67
4.3.2	14 Tage a.p.	68
4.3.3	3 Tage p.p.	68

4.3.4	8 Tage p.p.....	69
4.3.5	28 Tage p.p.....	69
4.3.6	60 Tage p.p.....	70
4.3.7	100 Tage p.p.....	70
4.3.8	Referenzwerte für den gesamten Zeitraum	70
4.4	Zusammenhang zwischen Pansenfüllung / Trockensubstanzaufnahme und Differentialblutbild	71
4.4.1	Zusammenhang WBC und Pansenfüllung / TS-Aufnahme	71
4.4.2	Zusammenhang relative Werte Leukozyten und Pansenfüllung	73
4.5	Zusammenhang zwischen weiteren Untersuchungsparametern und Differentialblutbild	73
4.5.1	BHB	73
4.5.2	NEFA	76
4.6	Zusammenhang zwischen ausgewählten Erkrankungen und Differentialblutbild	76
4.6.1	Klauenerkrankung	77
4.6.2	Stoffwechselerkrankung	79
4.6.3	Fruchtbarkeitsstörung.....	81
4.6.4	Retentio secundinarum	84
4.6.5	Totgeburten.....	86
5	Diskussion.....	89
5.1	Untersuchung des methodischen Fehlers	89
5.2	Dynamiken des Weißen Blutbildes im Laktationsverlauf.....	91
5.3	Referenzwerte.....	92
5.3.1	Allgemeine Referenzwerte	92
5.3.2	Referenzwerte im Laktationsverlauf	95
5.4	Weißes Blutbild und Futteraufnahme	96
5.5	Weißes Blutbild und ausgewählte Erkrankungen.....	97
5.5.1	Stoffwechselerkrankungen (BHB, NEFA)	97
5.5.2	Fruchtbarkeitsstörungen.....	97
5.5.3	Retentio secundinarum	98

5.5.4	Totgeburt.....	99
5.5.5	Klauenerkrankungen und Mastitiden	99
5.5.6	Interventionsmöglichkeiten gegen die peripartale Immunsuppression	99
6	Schlussfolgerungen.....	101
7	Zusammenfassung.....	103
8	Summary.....	106
9	Literaturverzeichnis	108
10	Anhang.....	136
	Intraday- und Interday-Fehler der stabkernigen neutrophilen Granulozyten und der Monozyten.....	136
	Variationskoeffizient der einzelnen Präparate an drei verschiedenen Differenzierungsdurchgängen	138
	Absolute und relative Werte der basophilen und juvenilen Granulozyten zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten	141
11	Danksagung	146
12	Selbstständigkeitserklärung	147

Abkürzungen

a.p.	ante partum
ANGPTL4	Angiopoietin-like protein 4
APP	Akute-Phase-Proteine
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
BasG	Basophile Granulozyten
BCS	Body Condition Score
BHB	Betahydroxybutyrat
BLAD	Bovine leukocyte adhesion deficiency
BLV	Bovine Leukämie Virus
BVDV	Bovine Virusdiarrhoe-Virus
CBC	complete blood count
CK	Creatin-Kinase
DLA	Dislocatio abomasi
EosG	Eosinophile Granulozyten
FGF21	fibroblast growth factor 21
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GLDH	Glutamatdehydrogenase
Hb	Hämoglobin
HCT	Hämatokrit
ICSH	International Council for Standardization in Haematology
Lymph	Lymphozyten
Mono	Monozyten
NEB	Negative Energiebilanz
NEFA	Non esterified fatty acids
NET	neutrophil extracellular trap
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGV	Nachgeburtsverhaltung
o.b.B.	ohne besondere Befunde
p.p.	post partum
PBMC	mononukleärer Zellen des peripheren Blutes
PI	physiologische Imbalance
RBC	Red blood cells / red blood cell count
RFD	Rückenfettdicke

ROS	reactive oxygen species
SAA	Serum-Amyloid A
SeG	segmentkernige neutrophile Granulozyten
StaG	stabkernige neutrophile Granulozyten
TLR	Toll-like-Rezeptor
TMR	Totale Mischratio
TS-Aufnahme	Trockensubstanzaufnahme
TNF- α	Tumornekrosisfaktor- α
VK	Variationskoeffizient
WBC	White blood cells / white blood cell count

1 Einleitung

Die Leistung der Milchkühe ist von ihrem Gesundheitsstatus abhängig. Kühe, welche sich nicht in einem gesunden Zustand befinden, haben eine geringere Milchleistung (Edwards und Tozer, 2004). In den letzten Jahren stieg die Milchleistung pro Kuh kontinuierlich an, wie in Tabelle 1 dargestellt. Die stetig weiter steigende Leistung des Milchrindes wird als Ursache für eine höhere Krankheitsanfälligkeit vermutet (Fleischer et al., 2001). Allerdings kamen auch Studien zu dem Ergebnis, dass es lediglich für die Fruchtbarkeit negative Auswirkungen bei sehr hoch leistenden Milchkühen gibt. Andere Krankheitsgeschehen wie Mastitiden, Stoffwechsel- oder Klauenerkrankungen besitzen demnach keine Beziehungen (Fölsche, 2012). Eine hohe Milchleistung spiegelt eine gute Herdengesundheit wider (Busch et al., 2003; Fölsche, 2012). Es ist folglich zu erwarten, dass gesunde Herden hohe Milchleistungen aufweisen, diese jedoch höhere Anforderungen an Fütterung und Haltungsbedingungen stellen.

Tabelle 1: Milchleistung je Kuh in Deutschland, in kg; mod. Nach Bundesanstalt für Ernährung und Landwirtschaft (September 2016) und Kanitz et al. (2003)

<i>Jahr</i>	<i>Nach Bundesanstalt für Ernährung und Landwirtschaft</i>	<i>Nach Kanitz et al (2003) *</i>
<i>um 1950</i>	2165	-
<i>1990/91</i>	4710	4885
<i>2000</i>	6122	7601
<i>2002</i>	-	8037
<i>2009</i>	6977	-
<i>2014</i>	7541	-

*nur für die Region Ostdeutschland und für die Rasse Deutsches Holstein

Aus ökonomischer Sicht sind hohe Leistungen der Tiere ebenso entscheidend: Der betriebswirtschaftliche Gewinn ist von einer hohen Milchleistung der Tiere abhängig (Fleischer et al., 2001; Staufenbiel et al., 2004a). Die Milchleistung pro Kuh ist der wichtigste Einflussfaktor für den Gewinn eines Milchviehbetriebes (Jaster, 2004). Neben den ökonomischen Aspekten gibt es ein in jüngster Zeit stärker werdendes gesellschaftliches sowie tierschutzrechtliches Verlangen nach gesunden und „glücklichen“ Tieren (Oltenacu und Broom, 2010; Spiller, 2015; Cannas da Silva et al., 2006). Die Gesundheit der Kühe ist demnach Grundvoraussetzung für eine hohe Leistung und einen damit verbundenen Gewinn, sie ist ebenso von gesellschaftlichem Interesse. Dadurch ergeben sich jedoch neue

Einleitung

Herausforderungen für Tierärzte und Landwirte (Cannas da Silva et al., 2006). Deswegen werden in der modernen Milchkuhhaltung eine gute Krankheitsprophylaxe sowie das frühzeitige Erkennen von Krankheiten immer wichtiger. Damit ergibt sich also eine Beziehung zwischen Tiergesundheit, Milchleistung und Gewinn.

Die meisten Krankheiten treten im peripartalen Zeitraum auf (Fürl, 1989; Drackley, 1999b; Drackley, 1999a). Aufgrund dessen wurden verschiedene Methoden zur Früherkennung bereits vor der Kalbung von sog. Problemkühe entwickelt. Somit ist es nötig, immer neue Konzepte zur Früherkennung von Krankheiten zu entwickeln und dazu soll diese Arbeit ihren Beitrag leisten. Es wird der Hypothese nachgegangen, ob sich das weiße Blutbild als Marker zur Früherkennung von Krankheiten und der Verminderung der Futteraufnahme eignet.

Folgende Zielstellungen wurden für diese Studie festgelegt:

- (1) Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen dem weißen Blutbild und der postpartalen Futteraufnahme sowie die daraus resultierende prognostische Aussagekraft des weißen Blutbildes.
- (2) Der Einfluss der peripartalen Phase und ausgewählten in diesem Zeitraum auftretenden Krankheiten auf das weiße Blutbild.
- (3) Die Bestimmung der methodischen Präzision bei der Leukozyten-Differenzierung.
- (4) Die Ermittlung des Einflusses des Laktationsstadiums auf die Leukozytenwerte sowie die Berechnung betriebsspezifische Referenzintervalle für hochleistende Milchkühe (>12.000 kg jährliche Milchleistung) der Rasse Holstein-Friesian.

2 Literatur

2.1 Früherkennung von Krankheiten

Klinische Parameter wie Körpertemperatur, Pansenaktivität, Atem- und Pulsfrequenz reichen zur frühzeitigen Identifikation von Problemkühen nicht aus. Sowohl der zeitliche Aufwand, alle Tiere auf diese Parameter zu untersuchen, als auch das verzögerte Auftreten dieser Klinik führte zur Entwicklung neuer Untersuchungsmethoden.

2.1.1 Kondition

Als guter Indikator für krankheitsgefährdete Tiere gilt die Kondition der Kühe in der Trockenstehphase (Boisclair et al., 1987; Gearhart et al., 1990; Ruegg et al., 1992; Drackley, 1999a). Der body condition score (Edmonson et al., 1989) oder die Messung der Rückenfettdicke (Staufenbiel et al., 1993) sind zur Klassifizierung geeignet.

Aussagekräftigere Ergebnisse liefert die sonographische Messung der Rückenfettdicke (Staufenbiel und Schröder, 2004). Die Wichtigkeit der Kondition von Milchrindern vor der Geburt ist schon lange bekannt und wurde immer wieder mit verschiedenen Erkrankungen in Beziehung gebracht (Morrow, 1976; Treacher et al., 1986; Metzner et al., 1993; Roche et al., 2009). Überkonditionierte Kühe vor der Kalbung leiden häufig an dem sog. Fettmobilisationssyndrom. Dies kann zur Leberverfettung führen und endet dann nicht selten letal (Morrow, 1976). Der komplexe Prozess der Lipolyse löst neuronale und hormonale Stimuli aus. Diese können Entzündungsgeschehen wie Immunzellmigration auslösen und negative Einflüsse auf die Kuhgesundheit haben (Contreras et al., 2017). Es bestätigte sich die Theorie, dass eine steigende Milchleistung mit einem höheren Konditionsverlust einhergeht (Pedron et al., 1993). Mitunter erleben Kühe mit hoher Leistung sogar das Doppelte an Konditionsverlust als ihre Artgenossen mit geringer Milchmenge (Gallo et al., 1996). Des Weiteren erkannte man, dass hochleistende Rinder einen späteren Wechsel von negativer zu positiver Energiebilanz nach der Kalbung erfahren (Kanitz et al., 2003). Die als optimal anzusehende Kondition ergibt sich jedoch nur für das spezifische Leistungsniveau einer bestimmten Herde. Die Ursache hierfür liegt in den exakt gleichen Umweltbedingungen innerhalb eines Bestandes, welche zwischen unterschiedlichen Herden nicht gegeben sind (Staufenbiel et al., 2003). Mit diesen Ergebnissen konnten Staufenbiel et al. (2003) eine Reverenzkurve für die Beurteilung von Kondition mittels Messung der Rückenfettdicke entwickelt werden, welche sich für die Anwendung in der Bestandsbetreuung eignet.

2.1.2 Stoffwechselfparameter

2.1.2.1 Ketonkörper

Mithilfe von blutchemischen Untersuchungen fand man weitere metabolische Parameter, welche den Gesundheitszustand der Kühe charakterisierten. Ketonkörper spiegeln den Stoffwechselstatus wider. Ketose kann als eine Entgleisung des Stoffwechsels betrachtet werden. Sie ist eine der bedeutendsten Krankheiten hochleistender Milchkühe (Gasteiner, 2000). Diese kann als Ursache ein Energiedefizit in der Früh lactation haben oder alimentär bedingt sein. In beiden Fällen spricht man von einer primären Ketose, da sie als eigenständige Krankheit auftritt. In Abgrenzung dazu unterscheidet man die sekundäre Ketose, welche nur in Assoziation mit anderen Erkrankungen vorkommt (McSherry et al., 1960). In der Mehrzahl der Tiere bleibt eine Ketose im subklinischen Stadium und daher oft unerkannt (Gasteiner, 2000). Überkonditionierte Kühe leiden häufiger an Ketosen (Grohn et al., 1983; Rukkwamsuk et al., 1999; Schulz et al., 2014; Shin et al., 2015), weshalb die Krankheit eine Komponente des „fat cow syndrome“ (Morrow, 1976) bildet. Die Stoffwechselkrankheit geht mit Leberverfettung einher und disponiert betroffene Kühe für andere Erkrankungen infektiöser und nicht infektiöser Art (Schulz et al., 2014; Goff und Horst, 1997b). Kühe, welche innerhalb der 1. Woche post partum (p.p.) eine Hyperketonämie entwickeln, zeigten ein höheres Risiko für Erkrankungen wie Dislocatio abomasi (DLA), Rückgang in der Milchleistung sowie aus der Herde abzugehen (McArt et al., 2012). Außerdem wurden Zusammenhänge mit zahlreichen anderen Krankheiten wie beispielsweise Endometritis und Nachgeburtsverhaltung oder Mastitis nachgewiesen (LeBlanc, 2010).

Neben Ketonteststreifen für Milch und Harn ist der Nachweis von Ketonkörpern im Blut mittels Analysegerät möglich. Eine weitere nicht invasive Methode, welche dem Nachweis von ketotischen Stoffwechselzuständen dient, ist die Konzentrationsbestimmung von Aceton in der ausgeatmeten Luft der Kühe. Diese Untersuchung beruht auf der Kombination von Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (Dobbelaar et al., 1996). Als wohl wichtigster Vertreter bei der Milchkuh erwies sich Betahydroxybutyrat (BHB) (Reid et al., 2009). Die Bestimmung von BHB-Werten im Blut gilt als Goldstandard für die Diagnostik von Ketosen (Van Saun, 2016). Es stellte sich heraus, dass sich die Serumwerte von BHB zusammen mit Non esterified fatty acids (NEFA) zur Herdendiagnostik mittels Poolproben sehr gut eignen (Borchardt und Staufenbiel, 2012). In Kühen mit subklinischer Ketose konnte eine erhöhte Immunantwort nachgewiesen werden. Jene äußerte sich in einer erhöhten Anzahl von Lymphozyten und in einer gesteigerten Aktivität mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMC) (Schulz et al., 2015). Allerdings wiesen andere Untersuchungen ein vermindertes Vorkommen der Neutrophilen im peripheren Blut nach (Ingvarsen und Moyes, 2015). Hoeben et al. (1999) fanden heraus, dass Ketonkörper eine inhibitorische Wirkung auf die

Literatur

Zellen des Knochenmarks bei Rindern besitzen. Zudem lieferten Untersuchungen bei Labormäusen Hinweise darauf, dass Ketonkörper nicht als Energiequelle der Leukozyten dienen, NEFA's jedoch möglicherweise schon (Newsholme et al., 1987). Eine prophylaktische Verabreichung von Propylenglykol ante partum (a.p.) vermag das Auftreten von ketotischen Belastungen bei Milchkühen zu senken (Barthmann, 2004).

2.1.2.2 NEFA

Jedes Hochleistungs-rind durchläuft eine Phase der negativen Energiebilanz (NEB) und eine damit verbundene gesteigerte Lipolyse (Van Saun, 2016; Drackley, 1999a; Herdt, 2000). Es kommt zu erhöhten NEFA-Werten im Blut. Mit Überschreitung der als physiologisch betrachteten Grenzwerte steigt das Risiko eines Fett-Leber-Syndroms. Zahlreiche Erkrankungen können mit hohen NEFA-Konzentrationen in Verbindung gebracht werden. Als bedeutend anzusehen sind vor allem die oben bereits genannte (subklinische) Ketose, DA, Nachgeburtshaltung und Metritis bzw. Fertilität im Allgemeinen (Van Saun, 2016; Fürll, 2016; LeBlanc, 2010). Neben der Indikation eines akuten Energiemangels haben NEFA's einen negativen Effekt auf die Funktion neutrophiler Granulozyten (Scalia et al., 2006; Hammon et al., 2006), was die Immunantwort der Kühe zusätzlich schwächt. Der oxidative burst der Neutrophilen scheint ebenfalls durch hohe NEFA-Konzentrationen geschwächt zu werden (Ster et al., 2012).

2.2 Entzündungsgeschehen bei Milchkühen

Im peripartalen Zeitraum sind Kühe am anfälligsten für metabolische und infektiöse Krankheiten (Drackley, 1999b; Goff und Horst, 1997b; Trevisi et al., 2012). In dieser Transitphase zeigen Kühe eine Immunsuppression (Mehrzad et al., 2001; Ingvarsten und Moyes, 2015). Dabei spielen Entzündungsprozesse eine wichtige Rolle und kommen bei allen Kühen vor (Bertoni et al., 2008). Entzündungsvorgänge dienen der Milchkuh als Schutz vor Infektionen und anderen Krankheiten. Falls diese jedoch in überschießenden oder unkontrollierten Reaktionen münden, wirken sie sich negativ auf die Kuhgesundheit aus (Sordillo et al., 2009). Bei diesen Entzündungsprozessen sind eine Vielzahl unterschiedlicher Komponenten des Immunsystems beteiligt, wobei Zytokine, Akute-Phase-Proteine und Neutrophile Granulozyten eine entscheidende Rolle beim Milch-rind einnehmen.

2.2.1 Zytokine

Allen Zytokinen gemeinsam ist, dass sie aus 10 – 25 kD große Peptide bestehen und von zahlreichen Immunzellen freigesetzt werden (Siegenthaler und Amann-Vesti, 2006). Aufgrund ihrer zahlreichen unterschiedlichen Aufgaben werden Zytokine oft anhand ihrer Funktionen zusammengefasst. Jedoch gibt es viele Zytokine mit pleiotroper Wirkung. Sie

Literatur

haben proinflammatorische, immunregulatorische sowie Zelldifferenzierung und Zellwachstum kontrollierende Funktionen, können aber auch chemotaktisch oder hämatopoetisch wirken (Loppnow, 2001; Foster, 2001; Siegenthaler und Amann-Vesti, 2006). Alle Leukozyten stehen in Wechselwirkungen mit einer Vielzahl an Zytokinen. Viele Zytokine stimulieren die Anzahl der Gesamtleukozyten oder auch white blood cells (WBC) und werden darüber hinaus von ihnen produziert. Aktuelle Forschungen versuchen die komplexen Zusammenhänge zwischen spezifischen Krankheiten, der Genexpression und Aktivität von Zytokinen sowie der Immunzellaktivität aufzudecken.

Im Nachfolgenden werden nur einige ausgewählte Zytokine vorgestellt und deren momentane oder zukünftig mögliche Relevanz für die Praxis aufgezeigt.

2.2.1.1 Wichtige Vertreter und deren möglicher Einzug in die Praxis

Von herausragender Bedeutung für das Entzündungsgeschehen bei Rindern scheint der Tumornekrosisfaktor- α zu sein. Bei der Milchkuh fand man typischerweise während eines Endotoxinschocks, z.B. aufgrund einer coliformen Mastitis, erhöhte Tumornekrosisfaktor- α (TNF- α) Werte (Sordillo und Peel, 1992; Hisaeda et al., 2001). Zudem konnte man eine Besserung der Symptome durch eine prophylaktische Interferon- γ Injektion nachweisen. Als Ursache wird eine durch Interferon- γ gesenkte TNF- α Produktion vermutet (Sordillo und Babiuk, 1991; Sordillo und Peel, 1992). Weiterführende Forschungen ergaben, dass TNF- α Werte im Serum generell im peripartalen Zeitraum ansteigen, was eine Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit gegenüber coliformen Mastitiden peripartal darstellen könnte (Sordillo et al., 1995).

Neben dem diagnostischen Interesse an TNF- α stellt es gleichzeitig auch einen Ansatz einer entzündungsregulierenden Therapie dar. Neueste in-vitro Untersuchungen suggerieren einen möglichen Einsatz von TNF- α bindenden Rezeptoren, welche eine entzündungshemmende und Zellvitalität erhaltende (Schleimhautzellen) Wirkung zeigen. Diese Rezeptoren entsprechen den bovinen Fc-Fragmenten von IgGs, welche spezifisch TNF- α binden: TNFR1-Ig und TNFR2-Ig. Es wurden signifikante Unterschiede in der Genexpression und Produktion von inflammatorischen Zytokinen durch bovine mononukleäre Zellen des peripheren Blutes nachgewiesen (Fujisawa et al., 2019).

Über ein anderes Zytokin namens Interleukin-2 zeigten in vitro Versuche, dass es in der Lage war, eine erhöhte Expression von Major Histocompatibility Complex - II (MHC - II) und dadurch eine erhöhte Lymphozyten-Aktivierung auszulösen (Sordillo et al., 1991a). Durch Euterinjektionen mit Interleukin-2, außer in sehr niedrigen Dosen, verschlechterte sich jedoch die Milchqualität und die Euterfunktion (Sordillo et al., 1991b).

Eine Studie zu Kühen mit subklinischer Endometritis belegte einen erhöhten Gehalt an TNF- α , IL-6 und dem als antiinflammatorisch geltenden IL-10 im Blutserum sowie in

Literatur

diagnostischen Uterusspülungen bei erkrankten Kühen (Brodzki et al., 2015). Zudem fand man heraus, dass es wohl einen Zusammenhang zwischen erhöhten NEFA-Werten bei Kühen in ketotischer Stoffwechsellage und einer gesteigerten Zytokin-Produktion durch neutrophile Granulozyten gibt (Zhang et al., 2018b): Kühe mit hohen BHB- und NEFA-Konzentrationen schienen eine signifikant höhere Produktion von IL-6, IL-1 β und TNF- α durch neutrophile Granulozyten aufzuweisen, welches wahrscheinlich auf eine durch die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4 (TLR-2 und 4) vermittelte Überaktivierung des NF- κ B-Signalwegs zurückzuführen ist (signifikant höheren Phosphorylierungsgrad von NF- κ B p65 und signifikant höhere TLR-2 und 4 Expression). Außerdem kamen Wang et al. (2018) zu dem Ergebnis, dass NEFA signifikant mit Hepatokin Serum-Werten (Angiopietin-like protein 4 (ANGPTL4) und fibroblast growth factor 21 (FGF21) korrelieren. Hepatokine umfassen eine Gruppe von Zytokinen, welche in der Leber gefunden werden.

Die Funktionen und Aufgaben der Zytokine sind bei weitem noch nicht abschließend geklärt. Ihnen wird jedoch eine immer größere Beachtung als möglicher Therapie-Ansatz geschenkt und dies nicht zuletzt aufgrund des jüngsten Vorkommens von multiresistenten Bakterien (Berglund et al., 2017) und Restriktionen im Einsatz von Antibiotika. So wird beispielsweise für die Chlorogensäure eine entzündungshemmende Wirkung vermutet. Diese scheint darauf zu beruhen, dass die Phosphorylierung von NF- κ B p65 inhibiert und die Expression von TNF- α , IL-1 β und IL-6 in vorher mit bakteriellen LPS stimulierten Epithelzellen des Euters von Rindern gesenkt wird (Gao et al., 2018). Chlorogensäure könnte deswegen zukünftig möglicherweise Einzug in der Mastitis -Therapie finden.

Ein bereits in der Praxis verwendetes Zytokin ist der „bovine granulocyte colony stimulating factor“, auch besser bekannt als Pegbovigrastim. Dieses Zytokin erhöht nach Injektion die Anzahl der neutrophilen segmentkernigen Granulozyten (Van Schyndel et al., 2018) im peripartalen Zeitraum und steigert deren Aktivität (Zimmermann, 2016). Darüber hinaus kamen McDougall et al. (2017) zu dem Ergebnis, dass nicht nur die Anzahl an neutrophilen Granulozyten, sondern auch Lymphozyten und Monozyten erhöhte Werte nach Pegbovigrastim-Injektionen aufwiesen. Außerdem wurde eine vermehrte Myeloperoxidase Freisetzung der neutrophilen Granulozyten beobachtet. Daraus schlussfolgerten McDougall et al. (2017) ebenfalls auf eine Erhöhung der Neutrophilen-Aktivität. In Verbindung mit zahlreichen peripartalen Krankheiten wie beispielsweise klinische Mastitis, Retentio secundinarum und klinische Metritis sowie für die produzierte Milchmenge konnten positive Effekte bei mit Pegbovigrastim behandelte Milchkühen nachgewiesen werden (Ruiz et al., 2017).

2.2.2 Akute-Phase-Proteine

Akute-Phase-Proteine (APP) sind entscheidend an der Regulierung von Entzündungsgeschehen beteiligt. Deshalb stehen sie schon lange im Mittelpunkt der Forschung in Human- und Tiermedizin (Petersen et al., 2004; Gruys et al., 2005; Eckersall und Bell, 2010). Trevisi et al. (2010) beschrieben den Zusammenhang zwischen NEB und erhöhten Entzündungsanzeichen in Form von Akute-Phase-Proteinen bei Milchkühen.

2.2.2.1 Wichtige Vertreter der Akute Phase Proteine

Man unterscheidet positive und negative APP. Letztere weisen während Entzündungsvorgängen niedrige Konzentrationen auf und reagieren damit entgegen den positiven APP. Klassische Vertreter der positiven APP sind Haptoglobin, Serum-Amyloid A, C-reaktives Protein, Zeruloplasmin und Fibrinogen. Zu den negativen APP zählt man u.a. Albumin, Paraoxonase und Retinol bindendes Protein.

2.2.2.2 Verwendung als Biomarker

Insbesondere beim Milchrind dienen sowohl positive als auch negative APP immer mehr als Biomarker, welche mit einer Vielzahl an Krankheiten assoziiert sind (Ceciliani et al., 2012). Dahingehend wird in Verbindung mit den klassischen Produktionskrankheiten des Milchrindes besonderes Augenmerk auf die nachfolgenden Vertreter gelegt (Tabelle 2). Die Bestimmung der APP erfolgt sowohl im Serum und Plasma als auch in der Milch und in uterinen Spülproben.

2.3 Leukozyten

Für Entzündungsprozesse von Bedeutung ist die Anzahl der Leukozyten im peripheren Blut. Dabei handelt es sich um einen vielseitigen Parameter. Dies kommt daher, dass mit ihm eine Gruppe von heterogenen Immunzellen umfasst wird. Allen gemeinsam ist deren Bildung durch verschiedene Vorläuferzellen im roten Knochenmark, wobei sich die weitere Differenzierung und Reifung bereits stark unterscheiden. Typisch ist ein Ansteigen oder Abfallen der Leukozyten bei bestimmten Erkrankungen. Zu diesen Leukozyten zählen die Granulozyten, welche anhand spezieller Färbungen in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten unterteilt werden.

Literatur

Tabelle 2: Akute-Phase-Proteine im Hinblick auf klassische Milchvieherkrankungen

Assoziierte Krankheiten	Positive APP	Negative APP
subklinische / klinische Mastitis	Hp, SAA 3 (mammary associated serum amyloid A3)↑ (Eckersall und Bell, 2010) (Thomas et al., 2015) C-reaktives Protein↑ (Thomas et al., 2015) ITIH4↑ (Piñeiro et al., 2004) (Soler et al., 2019)	
Ketose	SAA, Hp↑ (Abuajamieh et al., 2016) (El-Deeb und El-Bahr, 2017) lipopolysaccharide-binding-protein↑ (Abuajamieh et al., 2016) Fibrinogen, Zeruloplasmin, Alpha 1-acid glycoprotein↑ (El-Deeb und El-Bahr, 2017)	
Hypokalzämie	a.p. Hp↑ p.p. Hp↑ (Feijo et al., 2018)	a.p. Alb↓ p.p. Alb, Pon↓ (Feijo et al., 2018)
Endometritis	SAA↑ (Zhang et al., 2018a) (Brodzki et al., 2015) Hp↑ (Brodzki et al., 2015)	Alb↓ (Burke et al., 2010)
Ovar-Aktivität (ca. 37 d in Milch)	Hp↓ (Krause et al., 2014)	Alb, Pon↑ (Krause et al., 2014)
Metritis	Hp↑ (Chan et al., 2010) (Schneider et al., 2013)	Pon, Alb↓ (Schneider et al., 2013)
Leberfunktion / Liver activity index (Bertoni et al., 2008)	Hp↓ (Bionaz et al., 2007) (Bertoni et al., 2008)	Pon, Retinol bindendes Protein, Alb↑ (Bionaz et al., 2007) (Bertoni et al., 2008)
Klauenerkrankungen	Hp↑ (Smith et al., 2010) SAA↑ (Kujala et al., 2010)	

SAA – Serum-Amyloid A, Hp – Haptoglobin, Alb – Albumin, Pon – Paraoxonase, ITIH4 - Inter alpha trypsin inhibitor heavy chain 4

Literatur

Monozyten und Lymphozyten gehören ebenso zur Zellgruppe der Leukozyten. Bei Lymphozyten wird v.a. zwischen B-Zellen und T-Zellen unterschieden. Eine weitere Unterteilung kann zur Betrachtung von deren Funktionsmechanismen und spezifischen Rezeptoren sowie zum Charakterisieren ihrer Aufgaben sinnvoll sein. An dieser Stelle wird jedoch darauf verzichtet. Das Ansteigen bzw. Abfallen einer bestimmten Fraktion der Leukozyten kann Hinweise über den Verlauf oder zur Ursache von Erkrankungen liefern. So kommt es zum Beispiel bei einer parasitären Erkrankung häufig zu einer Eosinophilie, wobei auch basophile Granulozyten erhöht sein können. Eine ähnliche Veränderung im Zellbild manifestiert sich jedoch bei einer Allergie. Dies zeigt die Schwierigkeiten, die im Interpretieren von Blutbildern liegen. Darüber hinaus unterliegt die Leukozytenzahl gewissen Schwankungen, welche von vielen Faktoren beeinflusst werden. Neutrophile Granulozyten z.B. haben die Fähigkeit, sich an Endothelzellen anzuheften und an der Wand von Blutgefäßen entlang zu wandern (Abbassi et al., 1993; Diacovo et al., 1996; Aplin et al., 1998). Bei einem Anstieg des Blutdruckes jedoch steigt die Anzahl der frei zirkulierenden Neutrophilen und somit die Leukozytenzahl (Schmid-Schönbein et al., 1991). Sie ist also als eine Momentaufnahme zu betrachten.

2.3.1 Historische Entwicklung

Die wohl erste Erwähnung des lymphatischen Systems ist auf William Hewson zurückzuführen, der dieses bei Tieren untersuchte (Hewson, 1768). Etwa zeitgleich beschrieben Andral (1845) und Addison (1841) Leukozyten („*farblose Körperchen*“) im Blut und erkannten ihre Bedeutung bei Krankheiten. Addison und William (1843) beschrieb ebenfalls das Vorkommen von Leukozyten im Eiter. Damit waren Addison und Andral wohl die ersten, welche die damals sog. Farblosen bzw. Körperchen im Blut entdeckten (Weaver, 1954). Zahlreiche weitere Publikationen von Medizinern folgten und fanden ihren Höhepunkt mit der ersten Beschreibung von Färbemethoden für Blutzellen in Verbindung mit deren Morphologie und Einteilung. Dies geschah durch den deutschen Medizinstudenten Paul Ehrlich (Ehrlich, 1880; Hajdu, 2003). Durch ihn erfolgte bereits die Einteilung der „granulierten Zellen“ in Neutrophile, „Azidophile“ und Basophile. Diese unterschied er außerdem von den „nicht granulierten Zellen“ (Lymphozyten). Schließlich entdeckten van Furth und Cohn (1968) den Zusammenhang zwischen den im Blut zirkulierenden Monozyten und den im Gewebe vorkommenden Makrophagen und ihre gemeinsame Herkunft aus dem Knochenmark. Zu einem weiteren Fortschritt im Bereich der Hämatologie zählt die Entdeckung der „Dynamik“ bzw. Entwicklung der Granulozyten. Neutrophile Granulozyten wurden anhand ihrer Kern-Morphologie von Josef Arneth in 5 Klassen eingeteilt und in einer „neutrophilen Blutbildtabelle“ verzeichnet (Arneth, 1904). Die Klassen definierte er anhand der Anzahl der

Literatur

Segmente: Neutrophile mit einem, zwei, drei, vier oder als Klasse 5 mit fünf und mehr Kernsegmenten. Des Weiteren beschrieb er die prozentuale Abweichung einiger dieser Klassen bei pathologischen Prozessen. Schließlich versuchte er die Unterteilung fortzuführen, bis diese nach Meinung anderer Autoren zu kompliziert wurde. Er führte jedoch bereits die Begriffe der „Rechtsverschiebung“ und „Linksverschiebung“ ein (Wintrobe, 1939), welche auch als *Arnethsche Linksverschiebung* bekannt wurde (Zapel, 1937). Erstgenanntes beschreibt einen erhöhten Anteil der stärker segmentierten, also älteren Zellen, wohingegen die Linksverschiebung für einen erhöhten Anteil junger Zellen steht.

2.3.1.1 Leukozytenkurve und Kernverschiebung nach Schilling (1920; 1924; 1926)

Arneths Postulationen wurden schließlich von Schilling modifiziert und zugleich praxistauglicher gemacht. Er teilte die Leukozyten ein in basophile und eosinophile Granulozyten, Myelozyten, juvenile, stabkernige und segmentkernige Granulozyten, Lymphozyten sowie Monozyten. Außerdem beschrieb er die sog. regenerative Linksverschiebung, ähnlich wie Arneth (Schilling, 1920). Ein sog. Kernverschiebungsindex (KVI) wurde von Schilling (1926) definiert, den er nach dieser Formel berechnete:

$$\text{KVI} = \frac{M+J+St}{S}$$

M – Myelozyten, J – juvenile Granulozyten, St – stabkernige Granulozyten, S – segmentkernige Granulozyten

Darüber hinaus fand er Gesetzmäßigkeiten im Krankheitsverlauf, welche er als biologische Leukozytenkurve mit folgenden Phasen skizzierte: Die Neutrophile Kampfphase mit Kernverschiebung und/oder Reaktion der Neutrophilen, eine zum Teil weniger deutliche Monozytäre Abwehr- oder Überwindungsphase und schließlich eine Lymphozytäre Heilungsphase, welche von Eosinophilen begleitet sein kann (Schilling, 1924; Schilling, 1956).

2.3.1.2 Weitere Entwicklung und Nutzung der Leukozyten

In der Hämatologie fest verankerte Begriffe wie „Leukozytenkurve nach Schilling“ oder „Linksverschiebung nach Arneth und Schilling“ wurden in der Praxis zum Standardgebrauch und die Lehren dazu als allgemeingültig angesehen. So fanden sie auch schnell ihren Einzug in die Veterinärmedizin (Klein et al., 1940).

Durch die häufige Anwendung in der Praxis kam schnell das Verlangen nach vereinfachten Färbemethoden, welche zu Beginn des 20. Jh. zahlreich Einzug in die Hämatologie fanden: May, Grünwald (1902); Giemsa (1902); Wright (1902); Pappenheim (1901 und 1911) (v. Boroviczény et al., 1991; Pappenheim, 1911). Die Forschungen zur Leukozyten-Dynamik

Literatur

erfahren ebenfalls eine Erweiterung, beispielsweise durch Hoff (1928), welcher die regulierende Rolle des vegetativen Nervensystems in der Leukozyten-Dynamik erkannte.

2.3.2 Referenzwerte in den letzten 80 Jahren

In nachfolgenden Tabellen (Tabelle 3, Tabelle 4) ist eine Übersicht über die Entwicklung der Referenzwerte von Rindern dargestellt. Bei der Suche mithilfe von 4 Literaturdatenbanken (Web of Science, Google Scholar, PubMed, Primo – FU Berlin) wurden nachfolgende Referenzwerte gesunder Rinder am 02.05.2018 gefunden. Dabei wurden vor allem Studien zu Milchkühen ausgewählt, von denen jene mit Studientieren der Rasse Holstein Friesian bevorzugt wurden. Bei der Recherche verwendete „key words“ lauteten: „cattle/bovine/cow/dairy cow“ und „hematology/leukocyte/reference values/blood count“. Bei Google-Scholar wurde mit den entsprechenden Schlagwörtern auf Deutsch gesucht.

2.3.3 Einflussfaktoren auf das weiße Blutbild

Das weiße Blutbild der Rinder wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Das Alter des Tieres zeigt sich beispielsweise besonders deutlich (Mohri et al., 2007). Mit der Geburt beginnt bereits ein kontinuierliches Absinken der Leukozyten bis etwa 42d p.p., daraufhin erfolgt wieder ein Anstieg der WBC. Gleiches gilt für die Neutrophilen Granulozyten, wohingegen sich die Lymphozyten genau konträr dazu verhalten: Nach einem beginnenden Anstieg der Lymphozyten des Kalbes in den ersten Monaten, schließt sich ein leichter, konstanter Abfall an (Holman, 1956; Mohri et al., 2007). So sind die Neutrophilen bei Jungtieren noch die größte Fraktion der weißen Blutzellen, wohingegen bei den Adulten die Lymphozyten dominieren.

Allgemein weisen also junge Rinder bis ca. 3 Jahre im Vergleich mit ihren adulten Artgenossen höhere Leukozyten-Werte auf – mit $11,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ im ersten Lebensjahr erfolgt mit zunehmenden Alter ein Absinken der weißen Blutzellen auf ca. $5,0\text{-}6,0 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Canham, 1930; Monke et al., 1998; Kramer, 2000; Dirksen et al., 2006; Mirzadeh et al., 2010).

Literatur

Tabelle 3: Bovines Differentialblutbild 1929-1984

<i>Jahr</i>	<i>WBC</i>	<i>Lymph</i>	<i>Seg</i>	<i>Stab</i>	<i>Eos</i>	<i>Baso</i>	<i>Mono</i>
1929 ^a	7,80	50,7±7,4	30,7 ± 7,4	-	11,2 ± 4,4	0,24 ± 0,17	7,2 ± 2,7
1931 ^b	9,25	55,4	41,9	-	7,7	0,62	5,2
1938 ^c	9,57	42,3±9,6	34,9±8,8	-	12,4±7,0	1,0±1	9,5±3,5
1945 ^d	8,91	41,2±0,2	34,7±0,2	-	14,9±0,1	0,6±0,0	7,9±0,1
1946 ^e	10,27±0,045	57,3 ± 0,8	29,4 ± 0,7	-	7,3 ± 0,4	0,6±0,1	5,5±0,1
1955 ^k	9,35±2	4,9±1,25 ≈39,04- 65,78	3,45±1,35 ≈ 22,46-51,34	0,025±0,02 ≈0,05-0,48	0,63±0,525 ≈1,12- 12,35	0,025±0,04 ≈0-0,7	0,3±0,35 ≈0-0,7
1966 ^f	5,85	39,9±8,5	43,2±8,9	-	10,4±5,8	-	4,8±4,2
1971 ^g	12,33	6,18 ≈ 50,12	4,12 ≈ 33,41	-	1,15 ≈ 9,32	-	0,69 ≈ 5,6
1976 ^h	4,0-12,0 (8,0)	2,5-7,5 (4,5) ≈ 31,25-93,75	0,6-4,0 (2,0) ≈ 7,5-50,0 (25,00)	0-0,12 (0,02) ≈ 0-1,5 (0,25)	0-2,4 (0,7) ≈ 0-30 (8,75)	0-0,2 (0,05) ≈ 0-2,5 (0,63)	0,025-0,85 (0,4)
1980 ⁱ	7,40 ± 1,80	46,9 ± 10,6	38 ± 12	0,2 ± 0,5	7,9 ± 6,7	0,05 ± 0,02	4,1 ± 2,5
1984 ^j	6,21	2,65 ≈ 42,7	2,94 ≈ 47,3	-	0,19 ≈ 0,0	-	0,43 ≈ 0,1

WBC (x 10³/µl), Differenzierung (x 10³/µl und %), ggf. wurden absolute Werte von x 10³/µl in % *umgerechnet*, alle Werte wurden auf zwei Dezimalstelle gerundet; a - (Fraser, 1929); b - (Scarborough, 1931); c - (Bell und Irwin, 1938): n=35 Rinder, 50 Zellen pro Ausstrich ausgezählt; d - (Ferguson et al., 1945): n=25 Holstein Kühe/Färsen; e - (Rusoff und Piercy, 1946): 10 Holstein, 6 Jersey über 2a, 213 Proben; f - (Penny et al., 1966): Holstein Friesian Bullen 2 bis >10a; g - (Ryan, 1971): n=30 Holstein – Friesian Kühe, es wurden jeweils 200 Zellen ausgezählt; h - (Jain, 1976); i - (Lumsden et al., 1980): Holstein Friesian Kühe (n=172); j - (Reid et al., 1984): Milchkühe (n=156) aus einer Studie über Fettleber und Hämatologie – es wurden an dieser Stelle nur Kühe mit einem Fettanteil der Leber <20% aufgenommen; k - (Moberg, 1955) in (Schalm et al., 1975): weibliche Holstein-Friesian Kühe (n=34), 3 bis 4 Jahre alt, Leukozytenwerte im Bereich: Mean ± 1SD, es wurden absoluten sowie berechnete relative Werte (in %) dargestellt

Tabelle 4: Referenzintervalle des bovinen Differentialblutbildes im 21. Jh.

<i>Werte der UC Davis 2001 (George et al., 2010)</i>				<i>Herman et al. (2018)</i>		
	<i>Methode</i>	<i>Werte in</i> <i>x 10³/µl</i>	<i>Werte in</i> <i>%</i>	<i>Methode</i>	<i>Werte in</i> <i>x 10³/µl</i>	<i>Werte</i> <i>in</i> <i>%</i>
	<i>Referenzwert-</i> <i>Bestimmung</i>			<i>Referenzwert-</i> <i>Bestimmung</i>		
WBC	parametrisch	4,9-12,0	-	95%-Intervall	4,4-10,8	-
Lymphozyten	parametrisch	4,6-5,6	54,7- 66,7	95%-Intervall	2,0-6,2	27,8- 86,1
Neutrophile	parametrisch	1,8-6,3	21,4- 75,0	95%-Intervall	0,7-5,1	9,7-70,8
Stabkernige	95%-Intervall	-	-	-	-	-
Eosinophile	parametrisch	0-0,9	0-10,7	95%-Intervall	0,1-2,2	1,4-30,6
Basophile	95%-Intervall	0-0,3	0-3,6	95%-Intervall	0,0-0,2	0-2,8
Monozyten	parametrisch	0-0,8	0-9,5	95%-Intervall	0,1-0,8	1,4-11,1

2.3.4 Gesamtleukozytenanzahl

Die Anzahl der WBC oder Leukozyten ist ein entscheidender Parameter bei entzündlichen Krankheiten. Während der zellulären Immunantwort sieht man eine deutliche Erhöhung der WBC. Die Gesamtanzahl der Leukozyten wird hauptsächlich durch ihre größten Subpopulationen bestimmt – den Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten.

Allerdings repräsentieren die Leukozyten im peripheren Blut nur einen kleinen Teil der im Körper vorhandenen weißen Blutzellen. Patt und Maloney (1959) kamen aufgrund von zahlreichen Hinweisen der damaligen Literatur zu dem Schluss, dass beispielsweise die im peripheren Blut nachweisbaren Neutrophilen sich in einem Equilibrium mit einer weitaus größeren Population befinden müssen. Die Kinetik der Leukozyten wurde vor allem mithilfe von Diisopropylfluorophosphat studiert, welches radioaktiven und damit nachweisbaren Phosphor enthält. Diese radioaktive Substanz wird darüber hinaus schnell von den WBC aufgenommen, wodurch diese dann markiert werden (ATHENS et al., 1959). Man unterteilt bis heute die Population der Granulozyten in einen zirkulierenden und in einen marginalen Pool (Athens et al., 1961) sowie in einen Gewebepool (Omman und Kini, 2011).

2.3.4.1 Manuelle Bestimmungsverfahren

Die manuelle Zählung der Leukozyten mittels Zählkammern, auch Hämozytometer genannt, wurde zahlreich in der Praxis angewandt und von verschiedenen Forschern immer wieder weiterentwickelt. Unterschiedliche Zählkammern wurden konstruiert welche mit der Thoma - Zeiss`schen ihren Anfang nahmen (Lyon und Thoma, 1881; Diepgen, 1955) , über die Bürker-Kammer (Bürker, 1905) bis zur neuen Netzeinteilung in den Zählkammern durch Neubauer (1924) (Judson, 1925). Alle davon erfahren immer noch ihre Verwendung. Die beiden erstgenannten werden hauptsächlich zur Erythrozyten- (und Thrombozyten-)Zählung genutzt, die Neubauer-Zählkammer sowie die Schilling-Kammer zur Zählung der Leukozyten und Erythrozyten (Baum, 2019b). Als Probenmaterial eignet sich bei der Leukozytenzählung mittels K₂EDTA gerinnungsgehemmtes Blut besonders gut (Kreuzer und Bain, 2017).

Ein Aliquot (Teilmenge) der Blutroben wird mit dem Aliquot von bestimmten Hilfslösungen vermischt, welche die Erythrozyten lysieren und die Kerne der weißen Blutzellen anfärben. Zur Lyse der roten Blutzellen dient beispielsweise Essigsäure (3%) und zur Kernfärbung der Gentianaviolett, auch bekannt als Kristallviolett. Beides ist in der weit verbreiteten Türkschen Lösung enthalten (Bain, 1997; Niemeyer et al., 2006; Farkhondeh et al., 2014; Naegeli, 1923). Man macht sich dabei zunutze, dass alle kernhaltigen Zellen des Blutes (Leukozyten) der dreiprozentigen Essigsäure gegenüber resistent sind, wohingegen die Erythrozyten zur Lyse gebracht werden. Dies gilt jedoch damit auch für die Vorläuferzellen der Erythrozyten (Neth, 1979). Alternativ werden auch Essigsäure und Methylenblau verwendet.

Gebräuchliche Verdünnungen für die Blutproben sind 1:10 oder 1:20 (Blut : Hilfslösung) (Begemann, 1998; Mahlberg et al., 2014a).

Schließlich werden in den oben beschriebenen Zählkammern je nach Netzeinteilung die benötigten Quadrate mit definierter Größe ausgezählt. Durch Addition der gezählten Zellen und durch nachfolgende Multiplikation mit dem für die jeweilige Zählkammer spezifischen Faktor erhält man die Leukozytenzahl je Mikroliter. Der Faktor ist nachfolgender Formel entlehnt (Mahlberg et al., 2014b):

$$\text{Zellen}/\mu\text{l} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{ausgezählte Fläche} \times \text{Kammerhöhe} \times \text{Verdünnung}}$$

2.3.4.2 Automatisierte Bestimmungsverfahren

Auf der anderen Seite werden aufgrund der Einfachheit und Schnelligkeit Leukozyten häufig mittels automatisierter Geräte ausgezählt.

Es existieren verschiedene Verfahren, welche in der Regel auf der sog. Durchflusszytometrie basieren. Bei dem Durchflussverfahren oder „flow cytometric analysis“ entsteht ein Signal beim Durchtritt von jeder Zelle der Probe durch einen sog. „Transducer“. Dieses Signal wird je nach Messprinzip weitergeleitet und verarbeitet. Es können 3 Messverfahren unterschieden werden: Die Impedanzmethode, Streulicht- und Fluoreszenzmessung (Moritz,

Literatur

2014; Green und Wachsmann-Hogiu, 2015).

Die Impedanzmethode ist auf Wallace Coulter (1953) zurückzuführen. Bei diesem Verfahren wird verdünntes Blut durch eine Messapparatur mit kapillarem Spalt angesaugt. Dort befinden sich zwei Elektroden, zwischen denen sich die Stromstärke bei jedem Zelldurchtritt ändert. Die Stärke des Signales verhält sich proportional zum Partikelvolumen.

Physikalischer Hintergrund dabei ist die schlechte Leitfähigkeit der Zellen gegenüber dem Rest der Lösung. Es können die Größe und die Anzahl der Zellen bestimmt werden (Coulter, 1953; Fulwyler, 1965; Coulter und Hogo, 1970; Dunker, 2010).

Bei dem als Streulicht oder auch als „light scattering“ bekannten Verfahren wird ein Licht – oder Laserstrahl durch die Probelösung emittiert. Dabei werden die Strahlen so ausgesendet, dass sie auf die Zellen in ganz bestimmten Winkeln (besonders spitze, stumpfe oder rechte Winkel) zukommen (Willard et al., 1989; Burtis et al., 2012). Der Strahl trifft auf in der Probe enthaltene Blutzellen und es entsteht Streulicht. Dieses Streulicht (light scatter flow cytometrie) oder das durch die Blutzelle abgeschwächte Licht (absorbimetrisches Messverfahren) werden gemessen. Aus den ausgewerteten Daten können die Blutzellen anhand von Größe und Form sowie Granularität und Lobularität der Kerne differenziert werden (Roleff, 2006; Dunker, 2010; Green und Wachsmann-Hogiu, 2015). Zurück geht das Verfahren auf Marcandier (1928) der, die zuvor bereits mikroskopisch genutzte Methode automatisierte.

Die auf Fluoreszenz basierte Durchflussverfahren sind auf Dittrich und Göhde (1973) zurückzuführen. Bei dem auf Göhde beruhendem Prinzip werden Blutzellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und die Wellenlänge des Lichtes gemessen.

Frühe Blutanalysegeräte konnten zwischen 3 Fraktionen Lymphozyten, Monozyten oder Granulozyten unterschieden, sie nutzen entweder die Impedanz- oder Streulicht-Methode. In modernen Geräten werden häufig mehrere Verfahren kombiniert. Dadurch ist nicht nur eine Unterscheidung in Lymphozyten, Monozyten, Granulozyten, sondern auch eine Unterteilung der Granulozyten möglich (Holmes et al., 2009). Schließlich wurde auch die Identifizierung von Leukozyten-Antigenen, welche als Cluster of differentiation (CD) bezeichnet werden, möglich. Dazu werden fluoreszierende monoklonale Antikörper verwendet, deren Fluoreszenz nach erfolgter spezifischer Bindung gemessen wird (Bernard und Bousnell, 1984).

Eine weitere Methode zur Blutzellanalyse ist die Auftrennung der Zellpopulationen nach ihrer Dichte bzw. Gewicht. Dies findet Anwendung in der sog. „buffy coat analysis“ (Wardlaw und Levine, 1983), welche auch heute noch vom QBC VetAutoread verwendet wird (Becker et al., 2008).

Jedoch verwenden die Gerätehersteller nur die Grundprinzipien der beschriebenen Methoden. Oft werden verschiedene Prinzipien kombiniert und mit zytochemischen

Literatur

Reaktionen (Peroxidase etc.) ergänzt (Roleff, 2006) oder sogar grundlegend abgewandelt. Die auf dem Markt erhältlichen modernen Blutanalysegeräte unterscheiden sich zwischen ihren Messmethoden im Detail doch erheblich, was dazu führt, dass zum einen die Geräte schwer miteinander zu vergleichen sind, zum anderen unterschiedliche Messergebnisse liefern (Bruhn et al., 2011a). Ihnen gemeinsam ist jedoch die Entwicklung der letzten Jahre, welche Blutanalysegeräte immer bedienfreundlicher, kleiner und kompakter und schließlich auch präziser und reproduzierbarer werden ließ (Weiser et al., 2007).

2.3.4.3 Fehleranfälligkeit

Bei der Untersuchung von Blutproben handelt es sich um einen sehr komplexen Prozess, welcher zahlreiche Arbeitsschritte beinhaltet. Jeder einzelne Arbeitsschritt beherbergt dabei mögliche Fehlerquellen.

Die automatisierte Analyse von Blutproben verkleinert das Risiko menschlicher Fehler, bringt aber neue Schwierigkeiten mit sich. Trotzdem ist die elektronische Blutprobenanalyse der manuellen in Effektivität und Geschwindigkeit sowie Genauigkeit und Präzision überlegen. Dies führte dazu, dass die manuelle Auszählung der Leukozyten in Hämozytometern in der Praxis immer weniger Anwendung findet (Haferlach, 2012).

Bei der manuellen Auszählung sind vor allem folgende Fehlerquellen zu beachten (Bryan et al., 1935; Chamberlain und Turner, 1952; Tilsner und Greul, 2013):

- Durch zufällige Verteilung der Leukozyten und damit in den auszählenden Quadraten entsteht ein sog. „Feldfehler“
- Der Kammerfehler, welcher durch ungenaue Kammertiefe und unebene Deckgläschen, welche sich nach oben wölben können zu Abweichungen in der Füllmenge führen
- Fehler, welche im Zusammenhang mit den Pipetten stehen, z.B. ungenauer Füllung etc.
- Verdünnung der Blutprobe und Durchmischung
- Fehler durch die zählende Person, wie beispielsweise liegt die Zellen im zu zählenden Bereich oder außerhalb

Die publizierten Variationskoeffizienten (VK) zur manuellen Leukozytenzählung finden sich in Tabelle 5.

Für die automatisierte Analyse von Blutproben ergeben sich die möglichen Fehlerquellen aus den technischen Gegebenheiten. Aufgrund der Ähnlichkeit werden bei den automatisierten Verfahren die WBC und das Differentialblutbild hier zusammen betrachtet.

Tabelle 5: In der Literatur angegebene Variationskoeffizienten

<i>Autor (Jahr)</i>	<i>Variationskoeffizient</i>
Bryan et al. (1935)	4%
Berkson et al. (1939)	10,7%
Bruhn et al. (2011b)	10%
Burkhardt (2013) nach (Williams und Schneider, 1972) McPherson und Pincus (2017)	6,5% bei erhöhten und normalen Werten 15% bei Leukozytopenie

In der Humanmedizin werden Standardprotokolle erstellt, welche mögliche Performance-Tests (Test der Betriebsfähigkeit) bzw. Evaluierungen von Blutanalysegeräten beschreiben. Sie werden häufig auf die Veterinärmedizin übertragen und haben sich auch da etabliert. Bei solchen Evaluierungen werden in der Regel folgende Parameter getestet: Präzision (Reproduzierbarkeit oder „precision“), Richtigkeit („accuracy“), Linearität und die Untersuchung des „carry-over“ (International Council for Standardization in Haematology et al., 1984; Bourner et al., 2014). Allerdings sind zufriedenstellende Ergebnisse ebenfalls von den präanalytischen Faktoren, wie der Probennahme, Probenlagerung etc. abhängig (International Council for Standardization in Haematology et al., 1984). Zur Untersuchung der Präzision wird durch mehrmaliges Testen derselben Probe die SD oder der Variationskoeffizient (VK oder CV) als Prozentangabe bestimmt (International Council for Standardization in Haematology et al., 2014). Zudem wird jedoch zwischen der Präzision zwischen mehreren Probeserien und innerhalb einer Probeserie unterschieden. Bei Ersterem können verschiedene Einflussfaktoren (z.B. Neustart des Gerätes, carry-over, Rekalibrierung) eine entscheidende Rolle spielen (International Council for Standardization in Haematology et al., 1984). Als Präzision innerhalb einer Serie hat sich das zehnmahlige analysieren einer Probe, bei der Präzision zwischen den Serien das tägliche messen einer Probe für 20 bis 30 Tage etabliert (International Council for Standardization in Haematology et al., 2014). Shinton et al. (1982) empfehlen für Präzisionsstudien möglichst die gesamte Bandbreite an pathologischen Parametern mit einzubeziehen, z.B. Proben mit erhöhten, mittleren und niedrigen Blutwerten.

Die Linearität beschreibt den bestehenden proportionalen Zusammenhang zwischen einem Parameter und der Konzentration der Probe. Sie wird also bestimmt, indem verschiedene Aliquoten der Probe unterschiedlich stark verdünnt werden (Vis und Huisman, 2016). Um exakte Werte zu erhalten, muss die Herstellung der Dilutionen äußerst akkurat unter Verwendung gut kalibrierter Pipetten erfolgen (Shinton et al., 1982). Schließlich kann eine

Literatur

Regressionsanalyse erfolgen und der Graph sowie der Korrelationskoeffizient betrachtet werden (International Council for Standardization in Haematology et al., 2014).

Um die Richtigkeit bzw. „accuracy“ zu bestimmen, wird der Wert eines bestimmten Parameters des zu untersuchenden Gerätes mit dem gelieferten Wert einer Referenzmethode (falls vorhanden) oder zumindest mit einem anderen anerkannten Standardverfahren verglichen (International Council for Standardization in Haematology et al., 1984). Für das Differentialblutbild wird eine manuelle Bestimmung der Leukozyten mit dem Mikroskop als Referenzverfahren angesehen, wenn 400 Zellen ausgezählt werden (Koepke et al., 2007). Das Grundprinzip der „accuracy“ ist der Vergleich des gemessenen Wertes bzw. der Median einer Serie von Messungen mit dem wahren Wert, um so Systemfehler (bias) zu erkennen und zu quantifizieren. Es kann damit auch eine Kontrollprobe des Herstellers mit bekannten Werten zur Bestimmung genutzt werden (Jensen und Kjelgaard-Hansen, 2010).

Als Carry-over wird der Messfehler bezeichnet, welcher durch im Analysegerät zurückgebliebene Reste einer vorher analysierten Probe verursacht wird (Broughton et al., 1969). Vor allem Proben mit besonders hohen Werten, können nachfolgend analysierte Proben mit besonders niedrigen Werten (Zytopenie) beeinflussen (International Council for Standardization in Haematology et al., 2014).

Außerdem werden aufgrund der Einfachheit neue eingeführte Blutanalysegeräte mit bereits etablierten Geräten verglichen. Bei solchen Vergleichen sollten die Werte beider Geräte graphisch dargestellt werden, um einerseits die Übereinstimmung, andererseits die Abweichungen darzustellen. Dies wird mit Regressionsanalysen und Tests auf Korrelationen verbunden (Bland et al., 1986; Vis und Huisman, 2016). Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Betriebsfähigkeit und der Qualitätskontrolle von Laborgeräten ist die Verwendung von Sigma metrics (Nevalainen et al., 2000). Mit diesem Verfahren ist es möglich, die exakte Fehleranzahl eines analytischen Prozesses zu quantifizieren und zu veranschaulichen (Kumar und Mohan, 2018). Auch in der Veterinärmedizin hat Sigma metrics bei Evaluierungen von Blutanalysegeräten in einer Meta-Studie bereits Anwendung gefunden (Cook et al., 2017).

Ausgewählte Analysegeräte sollen eine Übersicht über deren Leistungsfähigkeit, insbesondere Präzision, geben. Dazu werden die in der Veterinärmedizin verbreiteten Analysegeräte Sysmex XT-2000iV (Sysmex, Japan), Vet ABC (Scil, Deutschland), ProCyte (idexx, USA), V-Sight hematology analyzer (A. Menarini Diagnostics, Österreich), and ADVIA 120 analyzers (Siemens AG, Deutschland) betrachtet. Diese werden in Tabelle 6 mit ihren Analysemethoden und den jeweils kompatiblen Tierarten gegenübergestellt. Tabelle 7 liefert die in der Literatur publizierten VK der Blutanalysegeräte.

Tabelle 6: Blutanalysegerät mit Analysemethoden und betrachteten Tierarten

Blutanalysegerät	Physikalisch / chemische Methode	Tierart	Referenz
Vet ABC	Durchflusszytometrie mit Impedanzmethode	Rind, Hund, Katze, Pferd, etc.	Becker et al. (2008)
V-Sight hematology analyser	Durchflusszytometrie mit Impedanzmethode und Kolorimetrie	Rind	Roland et al. (2014a)
ProCyte	Durchflusszytometrie mit Impedanzmethode und optische Fluoreszenzmessung	Rind, Hund, Katze, Pferd, etc.	Goldmann et al. (2013)
Sysmex XT-2000iV (TM)	Durchflusszytometrie mit Streulichtmethode und optischer Fluoreszenzmessung	Hund, Katze, Pferd	Lilliehöök und Tvedten (2009)
ADVIA 120 analyzers	Durchflusszytometrie mit Streulichtmethode und Kolorimetrie (Peroxidase-/Oxazine-Färbung)	Rind, Hund, Katze, Pferd, etc.	Moritz (2002)

Literatur

Tabelle 7: Präzision von ausgewählten in der Veterinärmedizin verwendeten Blutanalysegeräten für das weiße Blutbild (relative und absolute Werte)

Blutanalysegerät	Tierart	VK (in %) für das weiße Blutbild (absolute und relative Werte)							Referenz
		CBC (%)	WBC (%)	Lymphozyten (%) (Gpt/l)	Monozyten (%) (Gpt/l)	Neutrophile (%) (Gpt/l)	Eosinophile (%) (Gpt/l)	Basophile (%) (Gpt/l)	
Procyte	Rind	<3	1,9	5,62 6,25	24,54 24,13	2,03 3,51	0,00 35,7	-	Goldmann et al. (2013)
Vet ABC	Hund	-	2.2	-	-	-	-	-	Becker et al. (2008)
	Hund, Katze	-	1,2-3,2	-	-	-	-	-	van Leeuwen und Teske (1999)
V-Sight hematology analyzer	Rind	-	-	- >5	-	-	- <5	-	Roland et al. (2014a)
Sysmex XT-2000iV	Pferd	-	-	- 3,4	- 7,0	- 2,4	- 5,8	-	Lilliehöök und Tvedten (2009)
Advia 2120	Rind	-	2,2-4,0	21,3-4,1 ^a	29,1-30,7 ^a	5,3-4,9 ^a	41,3-11,4 ^a	12,4-14,5 ^a	Moritz (2002)
				22,0-6,1 ^a	28,8-29,3 ^a	5,0-5,6 ^a	40,7-14,7 ^a	13,2-15,9 ^a	

VK – Variationskoeffizient, CBC - complete blood count, WBC – white blood cell

^a Analyse von VK einer Serie (hintereinander gemessen) – VK über verschiedene Serien (dreifach an unterschiedlichen Tagen untersucht mit Einflussfaktoren wie An- und Abschalten des Gerätes, etc.)

2.3.5 Differentialblutbild

Das Differentialblutbild umfasst neben den WBC die absoluten und/oder relativen Werte der Granulozyten und Lymphozyten. Typischerweise werden in der Praxis drei-, fünf- oder sechsteilige Differentialblutbilder erstellt (Lymphozyten, Monozyten, segment- und stabkernige neutrophile Granulozyten, eosinophile sowie basophile Granulozyten). Sie dienen der Diagnostik von Infektionskrankheiten, Überempfindlichkeitsreaktionen, Intoxikationen und Neoplasien. Darüber hinaus können sie den Verlauf pathologischer Prozesse detektieren und so Verbesserungen oder Verschlechterungen frühzeitig erkennbar machen.

Viele Blutanalysegeräte in der Veterinärmedizin liefern Differentialblutbilder mit unterschiedlichen Anzahlen an Parametern. Bei vorhandenen Abnormalitäten können einige Analysegeräte „flags“, d.h. Markierungen anzeigen, welche diese ausweisen. Jedoch werden solche Abnormalitäten weder immer richtig erkannt noch richtig in die Analyse mit einbezogen. Vielmehr geben die Blutgeräte einen Ratschlag zur Überprüfung ihrer Ergebnisse. Manche liefern dazu noch Scatter-Diagramme über die Verteilung der Blutzellen, welche ausgewertet werden können. Trotzdem ist es in der Regel immer noch notwendig, manuelle Bestimmungen der Leukozyten sowie Erythrozyten und Thrombozyten durchzuführen. Meinkoth und Allison (2007), Weiser et al. (2007) sowie Harvey (2017) empfehlen das Anfertigen von gefärbten Blutausstrichen neben der Nutzung von automatisierten Verfahren, da einige Befunde nur bei mikroskopischer Untersuchung erhoben werden können. So können bei Bedarf, wie zum Beispiel bei Werten außerhalb des Referenzbereiches, pathologische Blutwerte, welche nicht zur Klinik des Tieres passen oder auch bei „flags“ der Blutgeräte, die bereits angefertigten Ausstriche untersucht werden. Außerdem können die Untersuchungen der Blutausstriche als zusätzliche Qualitätskontrolle dienen. Tabelle 8 soll eine Auflistung von Abnormalitäten, welche nur mittels Blutausstrichen erkannt werden können, darstellen (Weiser et al., 2007; Kraft und Dürr, 2013; Rebar, 2015).

Tabelle 8: Von Blutausstrichen zu erhebende pathologische Befunde

<i>Pathologische Befunde der Leukozyten</i>	<i>Pathologische Befunde anderer Blutzellen</i>
Linksverschiebung der Neutrophilen	abnormale Erythrozytenmorphologie (zahlreiche Abnormalitäten)
Hypersegmentierung der Neutrophilen	RNA-Reste – basophile Tüpfelung (z.B. Bleivergiftung Rind oder Kleintier)
Abnormale Granula der Granulozyten	Heinz-Körperchen
Einschlusskörperchen / infektiöse Agentien: aus den Gattungen Anaplasma, Erlichia, Hepatozoon	Einschlusskörperchen / infektiöse Agentien: aus den Gattungen Babesia, Mycoplasma,
Toxische Veränderung der Leukozyten: „cell rounding“ (Anschwellen), Vakuolisierung, Döhle-Körperchen, Zellkernveränderungen, basophile Färbung des Zytoplasmas	Thrombozyten-Aggregate
Immature Zellen	
Extrazelluläre Blutparasiten (Mikrofilarien, Trypanosoma)	
Hämatopoetische Neoplasien	

2.3.5.1 Bestimmungsverfahren

Die automatischen Differenzierungsverfahren wurden bereits bei der Leukozyten-Bestimmung (WBC) mit betrachtet. Deswegen wird hier lediglich auf die manuelle Differenzierung mittels Mikroskops eingegangen. Wie bereits oben erwähnt, gilt das manuelle Differenzieren der Leukozyten immer noch als Referenzmethode, falls 400 Zellen – d.h. 2x 200 von verschiedenen Untersuchern – ausgezählt werden (Koepke et al., 2007). Diese Methode wird jedoch mit fortschreitender Technik und Performance der automatisierten Verfahren immer mehr verdrängt werden und wahrscheinlich schon bald der Vergangenheit angehören. Allerdings ist sie derzeit zur Nachkontrolle von automatisiert bestimmten Differentialblutbildern, insbesondere abnormaler oder mit „flags“ versehener, noch unabdingbar (Pierre, 2002). Gründe für die manuelle Auswertung wurden bereits bei den automatisierten Verfahren unter 2.3.4.3 aufgezeigt.

Für die manuelle Bestimmung der Leukozyten ist es zunächst nötig, einen Blutausstrich herzustellen. Dafür werden gewöhnlich durchsichtige Objektträger aus Glas mit den Abmessungen 75 x 25 x 1mm verwendet (Houwen, 2002). Auf einem solchen wird ein Tropfen gerinnungsgehemmtes Blut mittels Kapillarröhrchen appliziert. Dieser Tropfen sollte Nahe an einem Ende des Objektträgers liegen, da er mithilfe eines zweiten Objektträgers

Literatur

ausgestrichen wird. Dies geschieht, indem der zweite Objektträger im 30 bis 45° Winkel kurz vor dem Blutropfen angesetzt, langsam rückwärts bis zur Berührung an den Tropfen geführt wird und anschließend in die Gegenrichtung bewegt (Allison und Meinkoth, 2007).

Wünschenswert ist ein Blutaussstrich mit gleichmäßig verteilten Zellen, welcher nicht die Kanten des Objektträgers berührt (Campbell, 2015). Die Dicke des Blutfilms hängt neben der Größe des Blutropfens außerdem vom Hämoglobingehalt, vom Winkel mit dem ausgestrichen wird sowie von der Geschwindigkeit mit der ausgestrichen wird ab. Je größer der Winkel oder schneller das Ausstreichen, umso dicker wird der Blutfilm (Vives Corrons et al., 2004). Große Zellen und Zellklumpen werden leicht nach vorn geschoben, wo sie sich dann in der sog. Fahne wiederfinden lassen (Harvey, 2017). Die Herstellung der Blutausstriche sollte am besten innerhalb von 15min nach Entnahme erfolgen (Weiser et al., 2007). Auch Geräte zur automatischen Anfertigung der Ausstriche stehen zur Verfügung (Benattar und Flandrin, 1999). Dabei sind Kalium-EDTA-Salze die Gerinnungshemmer der Wahl, da sie helfen, die Morphologie der Zellen zu bewahren (Meinkoth und Allison, 2007) und nicht die Färbequalität, wie z.B. Heparin, welches an Leukozyten bindet, beeinflussen (Harvey, 2012).

Anschließend erfolgt die Lufttrocknung der Ausstriche, bei feuchter Umgebung kann die Trocknung durch Heizblöcke oder Lufttrockner verstärkt bzw. verschnellert werden (Valenciano et al., 2013). Darauf folgt die Färbung der Präparate, welche in der Regel auf die Färbeprinzipien von Ehrlich (1880) bzw. Romanowsky (1891) zurückgehen. Unterschiedliche Färbungen wurden bereits unter 2.3.1 benannt. Alle Färbelösungen sollten in verschlossenen Containern bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden. In der Regel sind Fertiglösungen oder Färbepuder, welche in Methanol bzw. Puffer gelöst werden erhältlich (Houwen, 2002). Um eine gute Färbequalität zu erhalten, sollten die Ausstriche schnellstmöglich nach abgeschlossener Lufttrocknung gefärbt werden. Falls dies nicht möglich ist, sollte eine Fixierung mittels Methanols innerhalb von 1h mindestens jedoch innerhalb von 4h erfolgen, da sonst eine blaugraue Hintergrundfärbung durch das Plasma entsteht (Vives Corrons et al., 2004). Färbelösungen müssen regelmäßig erneuert werden, da sie an Intensität verlieren und einen Nährboden für Bakterien darstellen, was beides zu Problemen bei der Auswertung des Präparates führen kann (Allison und Meinkoth, 2007). Die [in Deutschland] wohl am häufigsten verwendete Färbemethode ist die Pappenheim-Färbung, eine Kombination aus May-Grünwald und Giemsa-Färbung: Eosinsaures Methylenblau mit Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung zur Gegenfärbung (Baum, 2019a). In Nordamerika hingegen wird häufig die Wright-Färbung (Methylenblau und Eosin) benutzt (Kreuzer und Bain, 2017). Beide gehören zur Gruppe der Romanowsky-Färbungen. Die European External Committee for External Quality Assurance Programmes in Laboratory Medicine (EQALM) working group 2004 empfiehlt ebenfalls die May-Grünwald-Giemsa-

Literatur

Färbung, aufgrund ihrer langanhaltenden Stabilität bei gefärbten Präparaten (Vives Corrons et al., 2004). Ein mögliches Färbeprotokoll kann nach Empfehlungen der French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP) folgendermaßen aussehen (Piaton et al., 2015):

- (1) May-Grünwald (50%, gepufferte) mit pH 6.8 für 3–5min
- (2) Giemsa-Lösung (10%, gepufferte) für 10–30 min
- (3) danach mit fließendem Wasser für 1–3min spülen

Die Differenzierung der getrockneten Präparate erfolgt unter dem Mikroskop. Mikroskope mit guter Qualität besitzen in der Regel 4 Objektive mit 4-, 10-, 40- und 100-fache Vergrößerung (Allison und Meinkoth, 2007). Letzteres wird mit Immersionsöl benutzt. Für ein Differentialblutbild müssen im Monolayer-Bereich mindestens 100 aufeinanderfolgende Leukozyten ausgezählt und differenziert werden (Campbell, 2015). Die normale Morphologie der Leukozyten im Blutausschlag in der Humanmedizin lassen sich entsprechenden nationalen Publikationen oder dem internationalen Consensus-Empfehlungen entnehmen (Palmer et al., 2015). In der Veterinärmedizin muss vorerst auf entsprechende Fachliteratur, ggf. für einzelne Tierarten, zurückgegriffen werden. Beim manuellen Erstellen eines Differentialblutbildes sollten folgende Schritte Anwendung finden (Houwen, 2001; Harvey, 2012; Allison und Meinkoth, 2007; Gulati et al., 2013; Harvey, 2017):

- (1) Überfliegen des Blutausschlages mit niedriger Vergrößerung, um festzustellen, ob drei typische Zonen erkennbar sind: Fahne, Monolayer und Körper des Ausschlages
- (2) Identifikation von Autoagglutinationen, Thrombozyten- oder Leukozytenaggregaten, Fibrinfäden sowie extrazelluläre Organismen (Blutparasiten)
- (3) Verifizierung der gleichmäßigen Verteilung der Leukozyten oder deren lokale Ansammlung an den Rändern oder in Fahne des Blutfilms
- (4) Mittels 1000-fachen Vergrößerung (Objektiv x Okular = 100 x 10) und Immersionsöl Differenzierung der ersten, mindestens 100 oder 200 gezählten Zellen in neutrophile segmentkernige, neutrophile stabkernige, eosinophile und basophile Granulozyten sowie in Monozyten und Lymphozyten; zur Vermeidung doppelter Auszählung, wird mäanderförmiges Durchwandern („battleman track“) des Präparates empfohlen; zur Eingabe der während des Mikroskopierens gezählter und differenzierter Zellen stehen Tasten-Zählgeräte oder Computertastaturen zur Verfügung
- (5) Überprüfung auf abnormale Befunde mit 1000-facher Vergrößerung, wie z.B. veränderte Morphologie von Blutzellen; Consensus-Empfehlung über Nomenklatur und Grading veränderter Zellen wurde von ICSH publiziert (Palmer et al., 2015), dieses kann auch für die Veterinärmedizin als Beispiel dienen

2.3.5.2 Fehleranfälligkeit der mikroskopischen Differenzierung

Die Fehleranfälligkeit und Ungenauigkeit wird in der Literatur häufig diskutiert (Rümke, 1985; Koepke et al., 1985) und führte nicht zuletzt dazu, dass automatisierte Analysegeräte beim Screening nach Krankheiten das manuelle Differentialblutbild schon weitestgehend abgelöst haben. Es kommt der manuellen Bestimmungen vor allem in der Nachkontrolle von auffälligen Präparaten immer noch größte Bedeutung zu. Jedoch konnte durch die sich verringende Anzahl der manuellen Bestimmungen, der personelle Aufwand sowie die benötigte Zeit und auch die damit verbundenen Kosten reduziert werden (Pierre, 2002; Weiser et al., 2007).

Bei der manuellen Differenzierung werden häufig die durch Auszählen von 100 Leukozyten bestimmten relativen Häufigkeiten mit dem automatisiert bestimmten absoluten Mittelwert der WBC multipliziert. Diese Methode ist überlegen gegenüber der Multiplikation eines manuell im Hämozytometer ausgezählten WBC-Wertes, allerdings trotzdem unpräzise (Rümke, 1985). Rümke et al. (1975) verdeutlichte außerdem, wie groß der Fehler bei sehr kleinen Vorkommen von bestimmten Leukozyten ist (Tabelle 9).

Tabelle 9: Darstellung der 95% Intervalle für die jeweils ausgezählten Leukozyten (N) im Vergleich zu den wahren Werten - „true values“ (Rümke et al., 1975)

<i>N</i>	<i>30% Lymphozyten</i>	<i>5% stabkernige</i>	<i>1% basophile</i>
100	21-39	1-10	0-3
200	24,0-36,5	2,0-8,0	0-2,5
500	26,0-34,2	3,2-7,0	0,2-2,0
1000	27,2-33,0	3,7-6,4	0,4-1,7

Nicht außeracht gelassen werden darf, das aus Tabelle 9 abzuleitende Problem beim Erstellen von Referenzwerten. Diese müssen immer an die Gesamtzahl an ausgezählten Zellen angepasst werden (Rümke et al., 1975). Des Weiteren besteht eine relativ hohe Variation zwischen verschiedenen Personen für die Bestimmung der Monozyten und stabkernigen Granulozyten (Koepke et al., 1985). Houwen (2001) stellte dar, dass die bestimmenden Personen bei der Einordnung von Monozyten und stabkernigen Granulozyten häufig unterschiedlicher Meinung waren, da die Definition morphologischer Kriterien bei diesen Zellen schwieriger als beispielweise bei eosinophilen Granulozyten sei. Die Präzision der manuellen Differenzierung ist in Tabelle 10 in Form von Variationskoeffizienten (VK) dargestellt.

Tabelle 10: Variationskoeffizienten bei der manuellen Leukozyten Differenzierung

<i>Lymphozyten</i>	<i>Eosinophile</i>	<i>Basophile</i>	<i>Monozyten</i>	<i>Neutrophile</i>	<i>Referenz</i>
20.0%± 12.2%	79.5%± 48.8%	133.6%± 49.8%	77.4%± 35.6%	13.1%± 9.3%	Giordano et al. (2008) ^a
32,5%	68,8%	263,2%	55,0%	6,6%	Fuentes- Arderiu et al. (2007) ^b
10,3%	27,7%	110%	22,5%	5,3%	Benattar und Flandrin (1999) ^c
15,36%	-	-	-	-	Simson und Groner (1995) ^d

a –100 oder 200 Zellen von Pferden (N=114) differenziert mit 3 unterschiedlichen Untersuchern; b – 100 Zellen differenziert von 58 Blutausstrichpaaren von 2 Untersuchern; c – 500 Zellen differenziert von mittels „wedge-Technik“ angefertigte Blutausstriche (N=7) von der gleichen Blutprobe; d – 2x 200 Zellen Referenzmethode für das Differentialblutbild (absolute Werte durch Multiplikation mit automatisiert bestimmten WBC) von N=697

Die Ungenauigkeiten kommen aufgrund von folgenden Fehlern zustande:

- (1) Fehler beim Anfertigen oder Färben der Blutausstriche
- (2) Fehler bei der Bestimmung/Differenzierung durch den Untersuchenden
- (3) Fehler durch ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Blutausstrich
- (4) Stichproben Fehler auch in Verbindung mit (3)
- (5) Dokumentationsfehler
- (6) Falls mithilfe der WBC absolute Werte berechnet werden, kommt zusätzlich der Fehler der automatisierten WBC Bestimmung hinzu

Eine zu lange Lagerung der Blutproben bedingt im Ausstrich typischerweise Pyknosen der Zellkerne und Integritätsverluste der Zellmembranen. Daraus resultiert, dass betroffene Zellen nicht mehr akkurat differenziert werden können (Jones und Allison, 2007). Auch bei der automatisierten Analyse sind Veränderungen im Differentialblutbild zu beobachten (Gulati et al., 2002). Die ungleichmäßige Verteilung der Leukozyten im Blutausstrich (3) kann durch folgendes Phänomen erklärt werden: Große Leukozyten (z.B. Monozyten) werden leicht an den Rand und in die Fahne des Blutausstriches gezogen. Dies führt zu einer Unterschätzung der relativen Häufigkeit der Monozyten von 5 bis 10% (Stiene-Martin, 1980; Houwen, 2002). Diese Ungleichverteilung kann jedoch vermieden werden, wenn bei der Herstellung der Blutausstriche eine Zentrifuge (z.B. Cytospin) Anwendung findet (Pierre, 2002). Um eine maximal erlaubte Ungenauigkeit (imprecision) festzulegen, benötigte man Daten über die biologische Variation beim Rind. Alternativ muss sonst auf für Menschen

Literatur

publizierte Werte zurückgegriffen werden. Die maximal erlaubte Ungenauigkeit entspricht der Hälfte der Variation eines Individuums (Petersen et al., 1996). Kjelgaard-Hansen und Jensen (2006) kommen bei ihren Berechnungen für Hunde und Katzen zu dem Schluss, dass sich die Ungenauigkeit nicht in akzeptierbaren Bereichen bei der manuellen Differenzierung befindet. Einzige Ausnahme waren die neutrophilen Granulozyten, es mussten dann jedoch 500 Zellen ausgezählt werden. Zudem schlussfolgerten die Autoren, dass es sich vermutlich ähnlich für andere Tierarten verhält.

Für Verlaufskontrollen sind manuelle Blutbilder ebenfalls nur mit Vorsicht zu benutzen, da bei 100 oder 200 ausgezählten Zellen der Zufall sehr großen Einfluss hat, vor allem bei wenig präsenten Zellen (Rümke et al., 1975). Kilgore (1920) berechnete die zufällige Abweichung in einem Differentialblutbild für die Lymphozyten für den Fall, dass 100 Zellen differenziert wurden und der tatsächliche Wert 50% beträgt. Die manuelle Auszählung würde Ergebnisse zwischen 35% und 65% liefern (Kilgore, 1920; Barnett, 1933). Im 21. Jhd. werden computergestützt Bilder von Blutaussstrichen digitalisiert, nachbearbeitet und anschließend automatisiert oder assistiert manuell ausgewertet (Nazlibilek et al., 2014; Rodríguez Barrero et al., 2018). Mit guter Genauigkeit von 97,9% zwischen verschiedenen Untersuchern und guter Präzision für die einzelnen Leukozyten erhält es als gute Alternative für automatisierte und manuelle Differenzierungsmethoden Einzug in die gängige Praxis. Rodríguez Barrero et al. (2018) geben folgende Präzision an: 93,4% für Lymphozyten, 97,37% für Monozyten, 79,5% für Neutrophile, 73,07% für Eosinophile und 100% für Basophile.

2.3.6 Interpretation der WBC und des Differentialblutbildes

Das Weiße Blutbild kann bei Milchkühen sowohl der Einzeltierbehandlung als auch dem Monitoring der Herden-Gesundheit dienlich sein. Allerdings kommt ihm vor allem bei der Diagnostik am Einzeltier besondere Bedeutung zu, da es entscheidende Informationen zusätzlich zur klinischen Untersuchung der Rinder liefert (Otter, 2013; Jones und Allison, 2007). In Tabelle 11 sind typischen Befunden des Weißen Blutbildes und damit assoziierte Krankheiten bei Kühen dargestellt.

Die Leukozyten im peripheren Blut verkörpern nur einen Anteil der Gesamtpopulation. Des Weiteren unterliegen sie einer Vielzahl an Einflüssen, beispielsweise Blutdruck, Katecholamine etc., die ihre, in einer Blutprobe gewonnene Menge, beeinflussen können (Schmid-Schonbein et al., 1991; McCarthy und Dale, 1988; Gekle, 2010).

Die Leukozytose spiegelt die Erhöhung der weißen Blutzellen, über definierte Referenzwerte hinaus, wider. In genauerer Betrachtung wird sie meist durch die Erhöhung einer der beiden größten Subpopulationen hervorgerufen, den neutrophilen Granulozyten oder Lymphozyten (Kroschinsky et al., 2007). Zusätzlich können auch weitere Leukozyten-Fractionen erhöht oder sogar erniedrigt sein, diese haben aufgrund ihres geringeren Vorkommens im

Literatur

peripheren Blut weniger Einfluss auf den Zahlenwert der WBC. Deswegen muss stets eine Differenzierung der Leukozyten erfolgen. Eine verringerte Anzahl an Leukozyten kann bei beginnender Endotoxin-Einwirkung, bereits nach ca. 6h, beobachtet werden (Saad und Ostensson, 1990; Kirbach et al., 1998; Blum et al., 2000). Auch Mykotoxine können zur Reduktion der WBC (zumindest bei Kälbern) führen (Gentry et al., 1984). Bei der „bovine neonatal pancytopenia“, eine z.B. durch BVDV-Immunsierung hervorgerufene fatale Depletion des Knochenmarks, kommt es ebenfalls zu verringerter Anzahl aller Blutzellen inklusive Leukozyten. Ursache der Knochenmarks Depletion sind wohl in diesem Fall Alloantikörper der Muttertiere nach Immunsierung (Bridger et al., 2011).

Die Immunzellen entwickeln sich im Knochenmark und der fetalen Leber, die Reifung der Lymphozyten erfolgt darüber hinaus auch in den Lymphknoten sowie der Milz und dem Thymus (Parkin und Cohen, 2001; LeBien und Tedder, 2008).

Der neutrophile Granulozyt gehört zur zellulären und angeborenen Immunantwort und ist in der Lage Entzündungen voranzutreiben und zu verstärken, aber auch zu regulieren und deren Auflösung einzuleiten (Jones et al., 2016; Hellebrekers et al., 2018). Er besitzt eine große Vielzahl an Funktionen, wie z.B. Phagozytose, Extravasion in umliegendes Gewebe, Regulierung der B- und T-Zell-Aktivität, „neutrophil extracellular trap“ (NET) Formation, Freisetzung der „reactive oxygen species“ (ROS) (Kolaczowska und Kubes, 2013). Die Neutrophilen zeigen unterschiedliche Dynamiken, auf die bereits kurz eingegangen wurde. Man unterscheidet außerdem den zirkulierenden bzw. circulating pool der Granulozyten vom sog. marginating pool, welcher sich am Endothel der Blutgefäße befindet. Letzterer dient als Reserve. Dadurch kann sich beispielsweise aufgrund von Stress die Anzahl an zirkulierenden Granulozyten schnell erhöhen. Weitere Reserven liegen in der Lunge (v.a. Granulozyten) und Milz (v.a. Lymphozyten) (Berkow und Dodson, 1987; Benschop et al., 1996). Insbesondere beim Rind sind zahlreiche Ursachen neutrophiler Dysfunktionen bekannt: Bovine Virusdiarrhoe-Virus (BVDV), Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD), Chédiak-Higashi-Syndrom; Vitamin E-Selen-Mangel insbesondere bei peripartalen Milchkühen, Stress. Diese Pathologien beeinflussen weniger die Anzahl, sondern viel mehr die Phagozytose-Aktivität, die vasale Adhäsion oder die Chemokin gesteuerte Bewegung wie im Falle von BLAD, die Degranulationsfähigkeit sowie viele andere Funktionen der neutrophilen Granulozyten (Gerardi, 1996; Nagahata, 2004; Ogawa et al., 1997; Roth et al., 1981; Hogan et al., 1993; Earley et al., 2017).

Der Knochenmark-Pool der Granulozyten fällt beim Rind vergleichsweise gering aus, weshalb es bei akuten entzündlichen Prozessen häufig zu einer anfänglichen Neutropenie kommt, bis sich darauffolgend eine Neutrophilie mit Linksverschiebung einstellt (Bertram, 1985; Wood und Quiroz-Rocha, 2010). Die initiale Neutropenie dauert meist 24 bis 48h. Anschließend stellt sich eine Linksverschiebung ein. Bei dieser wird zwischen degenerativer

Literatur

und regenerativer unterschieden (Jones und Allison, 2007). Bei der degenerativen Linksverschiebung herrscht eine Neutropenie sowie zahlenmäßige Überlegenheit der stabkernigen und juvenilen gegenüber den segmentkernigen Neutrophilen vor. Beim regenerativen Typ hingegen besteht eine Neutropenie und zusätzlich zur erhöhten Anzahl der immaturen Neutrophilen sind auch segmentkernige in größerer Menge vorhanden (Chase et al., 2017). Gerade bei subakuten Erkrankungen sollte eine milde Neutrophilie beim Rind nicht unterschätzt werden (Otter, 2013). Bei gesunden adulten Kühen betrage das N:L (Verhältnis Neutrophile zu Lymphozyten) in etwa 1:2, während bei juvenilen Rindern die neutrophilen Granulozyten dominieren (Jones und Allison, 2007; Roland et al., 2014b). Bei den Lymphozyten werden im peripheren Blut des Rindes unterschiedlich große angetroffen (small, medium, large), welche hauptsächlich zu den B- und T-Zellen gehören (Jones und Allison, 2007). Lymphozytosen sind verhältnismäßig selten vorkommende Befunde. Als prominentes Beispiel wäre die durch das Bovine Leukämie Virus (BLV) verursachte Leukose zu nennen (Frie und Coussens, 2015). Erhöhte Lymphozytenwerte können ebenfalls bei der Genesung nach infektiösen Krankheiten beobachtet werden (Otter, 2013). Gleiches gilt für erhöhte eosinophile Granulozyten, welche als Zeichen der Regeneration („Eosinophile Morgenröte“), wie bereits bei der Leukozyten Kurve nach Schilling (1920) beschrieben, gelten. Besondere Veränderungen sind auch nach Brucella-Infektionen oder Vakzinationen zu erkennen. Man kann einen Anstieg der WBC sowie eine Neutrophilie bei gleichzeitig niedrigen Lymphozyten beobachten (Bell und Irwin, 1938; Lundquist et al., 1949). Bei einer Farn-Vergiftung von Kühen kann mitunter eine Monozytose auftreten (Perez-Alenza et al., 2006).

Glucocorticoid-Injektionen bzw. Stress führen zu den typischen Blutbildbefunden einer milden Neutrophilie, Eosinopenie, Lymphopenie sowie Monozytose (Anderson et al., 1999). Abnormale Befunde der Leukozyten im Blutausschlag können ebenfalls Hinweise auf bestimmte Erkrankungen geben. Die sog. erworbene (auch Pseudo-) Pelger-Huët-Anomalie kann beim Rind für wenige Tage bei entzündlichen Prozessen beobachtet werden (Osburn und Glen, 1968). Dabei handelt es sich um eine Hyposegmentierung der Zellkerne von Granulozyten, wobei typische ausgereifte Chromatinstrukturen zu erkennen sind (Weiss und Wardrop, 2011). Große Granula sind beim Chediak-Higashi-Syndrom im Zytoplasma der Leukozyten zu finden. Speziell wurden sie in den neutrophilen und eosinophilen Granulozyten beim Rind (z.B. Hereford, Wagyu, Brangus) beschrieben (Ogawa et al., 1997; Yamakuchi et al., 2000). Weiterhin können toxische Leukozyten bei schweren bakteriellen und viralen Infektionskrankheiten zu finden sein. Morphologisch besitzen solche Zellen meist einen größeren Anteil an sich basophil anfärbenden Zytoplasma, zudem können Vakuolisierungen oder auch azurophile Granula zu finden sein (Weiss und Wardrop, 2011). Für Lymphozyten jedoch ist es keineswegs selten und abnormal, dass sie im Zytoplasma

Literatur

azurophile Granula aufweisen – solche Lymphozyten werden den „natural killer cells“ zugeordnet (Jones und Allison, 2007).

Tabelle 11: Befunde des Weißen Blutbildes und Beispiele für damit assoziierte Krankheiten

Veränderung des Blutbildes (unterschiedlichen Grades)	Assoziierte Erkrankung	Referenz
Leukozytose	Entzündungsgeschehen aufgrund von infektiösen Krankheiten, Stoffwechselstörungen, Stress, Dehydratation	Otter (2013)
	Traumatische Retikuloperitonitis	Braun et al. (2018)
	Hitzestress	Wegner et al. (1976)
	Sozialstress Mensch (Rind?)	Engler et al. (2004)
Leukozytopenie	Fettlebersyndrom / Hyperlipomobilisationssyndrom (erniedrigte Neutrophile, Lymphozyten und Eosinophile)	Reid et al. (1984)
	Salmonellose, Rickettsiose, Paratuberkulose, BVD, IBR, DLA, bakterielle Septikämien	Dirksen et al. (2006)
Neutrophilie	Staphylokokken-Mastitis	Swain et al. (2015)
	Endotoxin-Wirkung bei E. coli Mastitis	Paape et al. (2003)
	Endometritis	KIM et al. (2005b)
	Lahmheit (Klauenerkrankungen) und hohes N:L-Verhältnis ¹	O’Driscoll et al. (2015)
	Septische Arthritis	Shearer et al. (2012)
	Trypanosoma evansi	Sivajothi et al. (2014)
	Hyperlipomobilisationssyndrom / „fat cow syndrome“ (ebenfalls erhöhte stabkernige neutrophile Granulozyten)	Morrow (1976)
	BLAD	Nagahata (2004)
	Transportstress	Earley et al. (2017)

Literatur

Veränderung des Blutbildes (unterschiedlichen Grades)	Assoziierte Erkrankung	Referenz
Neutropenie	Perakute Endotoxin-Wirkung	Blum et al. (2000)
	idiopathische nekrotisierende Enteritis des Kalbes	Otter (2013)
	Metritis (inklusive verändertem CD4+:CD8+ Verhältnis)	Magata et al. (2016)
	Bluetongue disease	MacLachlan und Thompson (1985)
	Initial bei hochgradigen, akuten entzündlichen Erkrankungen wie gram-negativ Sepsis, Metritis, Mastitis, Peritonitis, Pneumonia	Jones und Allison (2007)
Lymphozytose	BLV (persistierende Lymphzytose der B-Zellen)	Schwartz und Levy (1994) Frie und Coussens (2015)
Lymphopenie	Metritis	Magata et al. (2016)
Monozytose	Farnvergiftung Stress	Perez-Alenza et al. (2006) Anderson et al. (1999)
Eosinophilie	Endoparasiten, z.B.: Dictyocaulus viviparus Trypanosoma evansi Fasciola hepatica	Weber und Rubin (1958) Sivajothi et al. (2014) Dietrich et al. (2015)
	Geringgradig bei Ektoparasiten, z.B. Linognathus vituli, Bovicula bovis	Oormazdi und Baker (1980)
	Allergie mitunter bei Emphysemen	Chase et al. (2017)
Basophilie	Allergie parasitären Erkrankungen (Zeckenbefall)	Otter (2013)

¹ Verhältnis Neutrophile:Lymphozyten

2.3.7 Laktationsdynamik der Leukozyten im peripartalen Zeitraum

Die WBC erreichen ihr Maximum zur Geburt, gleiches gilt für die neutrophilen Granulozyten. Die Eosinophilen und Lymphozyten sind jedoch niedriger zum Zeitpunkt des Partus (Klinkon und Zadnik, 1999). Dieses Verhalten der Eosinophilen und Lymphozyten konnten Merrill und Smith (1954) genauso wie einen Anstieg der WBC und Neutrophilen zum Tag des Partus

Literatur

beobachten. Des Weiteren fanden sie in den ersten fünf Tagen p.p. folgende Ergebnisse: Fallende WBC und Neutrophile sowie ansteigende Lymphozyten, Eosinophile und Monozyten. Paterson (1957) konstatierte einen Anstieg der WBC a.p. sowie einen Abfall p.p. Gemäß einer weiteren Studie zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Neutrophilen in den 0-14d p.p. entnommenen Blutproben, während die WBC, die Eosinophilen und die Lymphozyten weiterhin niedrige Werte aufweisen (Belić et al., 2011). Guidry et al. (1976) konnten einen Anstieg der neutrophilen Granulozyten ab der zweiten Woche p.p. verzeichnen. Lee und Kehrlı (1998) beschrieben zunächst hohe Leukozyten und Neutrophilen Werte zur Geburt, welche schließlich bis ca. 5d p.p. abfallen, um dann langsam wieder anzusteigen.

Hussain und Daniel (1992) kamen zu dem Ergebnis, dass nach physiologischer Kalbung ein Abfall der Leukozyten sowie der Neutrophilen bis ca. 8d p.p. zu verzeichnen ist. Darüber hinaus kamen Deltilleux et al. (1995) zu dem Ergebnis, dass sich nach der Geburt ein Anstieg immaturer (stabkerniger) Neutrophiler ca. 14dp.p. manifestiert.

Zusammenfassend fanden die Mehrzahl der Autoren von a.p. zur Geburt hin einen Anstieg der WBC und Neutrophilen sowie einen Abfall der Lymphozyten und Eosinophilen (Merrill und Smith, 1954; Paterson, 1957; Guidry et al., 1976; Saad et al., 1989; Klinkon und Zadnik, 1999). Ab der Geburt bis 5-8d p.p. wurden in den meisten Studien folgende Veränderungen beobachtet: Fallende WBC und Neutrophile sowie einen Anstieg der Lymphozyten, Eosinophilen und Monozyten (Merrill und Smith, 1954; Paterson, 1957; Saad et al., 1989; Lee und Kehrlı, 1998).

Die Einwirkung des Geburtsstresses scheint für die hämatologische Dynamik verantwortlich zu sein, auch bei Dexamethason-Injektionen wurden ähnliche Ergebnisse erzielt: Leukozytose mit Neutrophilie, Eosinopenie, Lymphopenie und Monozytose (Anderson et al., 1999). Burton et al. (2005) konnten nachweisen, dass bei gebärenden Kühen mit hohem natürlichen Cortisol Einfluss einige wichtige Abwehrmechanismen der Neutrophilen vermindert sind. Jedoch werden die Anzahl und die Lebenszeit der Neutrophilen im peripheren Blut gesteigert.

3 Material und Methoden

3.1 Allgemeines

3.1.1 Untersuchungsbetrieb und Management

Im Rahmen einer Bestandsanalyse wurden in den Zeiträumen 04.05.2015 – 07.04.2016 und 12.04.2016 – 21.11.2016 eine Vielzahl an Untersuchungen durchgeführt. In deren Umfang wurden die Daten der hier vorliegenden Studie erhoben. Der Untersuchungsbetrieb liegt in Sachsen-Anhalt. In dem Betrieb befanden sich im Schnitt etwa 420 Kühe, vorwiegend der Rasse Holstein-Friesian. Nachfolgende Tabelle 12 gibt einen Überblick über die Herdenleistung.

Tabelle 12: Milchleistungsdaten der untersuchten Herde

	<i>Untersuchungszeitraum 1</i>	<i>Untersuchungszeitraum 2</i>
	(04.05.2015 – 07.04.2016)	(12.04.2016 - 21.11.2016)
Durchschnittliche Jahresleistung (kg)	12009	12119
Fettgehalt (%)	3,71	3,74
Eiweißgehalt (%)	3,44	3,46
Durchschnittliche 305-Tage-Leistung (kg) bei Kühen in der 1. Laktation	10321	10578
Durchschnittliche 305-Tage-Leistung (kg) bei Kühen in der 2. Laktation	-	12745
Durchschnittliche 305-Tage-Leistung (kg) bei Kühen in der ≥ 2. Laktation	12411	-
Durchschnittliche 305-Tage-Leistung (kg) bei Kühen in der >2. Laktation	-	12575

Die Kühe wurden dreimal täglich in einem doppelt angeordneten Side-by-Side-Melkstand mit jeweils 16 Melkplätzen gemolken. Die Melkroutine erfolgt i.d.R. nach gleichem Standard mit Vormelken in einen Vormelkbecher, Euterreinigung, Anlegen des Melkgeschirrs, folgender automatischer Melkvorgang sowie Dippen und Melkzeugzwischenendesinfektion. Dabei war das Tragen von Handschuhen für das Melkpersonal obligatorisch. Die Reproduktion erfolgte ausschließlich mittels künstlicher Besamung. Alle Milchkühe besaßen einen Transponder am Ohr zur automatischen Tiererkennung.

Material und Methoden

3.1.1.1 Trockensteher und Vorbereitung für das Trockenstellen

Zur Vorbereitung auf das Trockenstellen bekamen Milchrinder eine spezielle Ration, um ihre Milchleistung auf niedrigem Niveau zu halten. Diese wurde den Kühen über einen Futtertisch angeboten. Kühe mit etwa 56 (± 6) Tagen vor errechnetem Kalbedatum sind schließlich in die Trockenstehergruppe zugeordnet worden. Tiere mit einer Milchleistung unter 13kg Milch pro Tag wurden zeitiger trockengestellt. Zum Trockenstellen wurde ein interner Zitzenversiegler auf Bismut – Basis verwendet. Bei Rindern mit veränderter Milch wird ggf. antibiotisch trockengestellt. Die dort befindlichen Milchrinder wurden auf Tiefstreu in einem Laufstall gehalten. Bei diesen Tieren wurde der BCS durch den Herdenmanager erhoben. Tiere mit zu hohem oder zu niedrigem BCS sind disponiert für Krankheiten in der Transitphase (Fettmobilisationssyndrom, Ketose, etc.). Solche konnten vom Herdenmanager vermerkt und weiterhin genauer beobachtet werden.

3.1.1.2 Vorbereitungsgruppe

Die Milchrinder der Vorbereitungsgruppe befanden sich ebenfalls in einem Laufstall und stehen auf Tiefstreu. Milchkühe mit ca. 22 - 30 Tagen vor errechnetem Kalbetermin wurden dieser Gruppe zugeführt und ca. 14 Tage a.p. mittels Gatter voneinander getrennt. Sie bekamen eine besonders energiereiche Ration über ein Trogsystem gefüttert. Dieses konnte individuell mittels automatischer Tiererkennung Portionsgrößen abwiegen. Dadurch war eine genaue Messung der Futteraufnahme möglich. Wie bei allen anderen Haltungsabschnitten wurde die Ration ad libitum angeboten.

3.1.1.3 Kalbung

Das Stallpersonal überwachte die Kalbung. Bei Verdacht auf eine unphysiologische Geburt bzw. Dystokie wurde ggf. die Kuh im Partus untersucht. Bei Bedarf wurden Lage-, Stellungs- oder Haltungsanomalien des Kalbes korrigiert. Als zusätzliche Entbindungshilfe bei schwereren Geburten konnte das Kalb an Stricken befestigt herausgezogen werden. Dabei wurde stets versucht, Verletzungen der Mutterkuh und des Kalbes zu vermeiden. Nach der Kalbung stand den Rindern lauwarmes Wasser mit einem Glycerin-Propylenglykol-Präparat der Firma Schaumann zur oralen Aufnahme zur Verfügung.

Frischabkalber wurden noch bis ca. 7 Tage nach der Kalbung in einer separaten Gruppe gehalten. Sie bekamen weiterhin energiereiches Futter bereitgestellt. Klinisch gesunde Tiere verließen anschließend dieses Abteil und wurden der Frischlaktierenden – Gruppe zugeordnet.

3.1.1.4 Frischlaktationsgruppe

In diesem Abschnitt befanden sich die Tiere in einem Offenlaufstall mit Hochliegeboxen. Diese Liegeboxen waren mit Gummimatten ausgelegt und mit Sägespänen eingestreut, welche zusätzlich regelmäßig gekalkt wurden. Der Stallboden bestand aus Planbeton und wurde mittels fest installiertem Faltschieber entmistet. Für die Milchkühe begann in dieser Gruppe wieder die sog. Einzelfutterstrecke mittels automatischer Wiegetröge und Einzeltiererkennung. Mindestens 100d p.p. blieben die Milchrinder in dieser Gruppe.

3.1.1.5 Hochleistungsgruppe 1 bis 4

Die Haltungsbedingungen der Hochleistungsgruppen entsprachen denen der Frischlaktierenden. Einziger Unterschied war die Futterdarbietung in den Hochleistungsgruppen 3 und 4, bei denen das Futtermittel auf einem Futtertisch angeboten wurde. Eine automatisierte Futteraufnahmemessung erfolgte dort nicht mehr.

3.1.1.6 Eutergruppe

Rinder mit veränderter Milch wurden separiert in eine eigene Gruppe umgestellt. Deren Aufstallung erfolgte auf Spaltenboden. Bei diesen Kühen wurde bei Bedarf je nach Erreger und Grad der Erkrankung eine individuelle Behandlung durchgeführt. Zudem fand das Melken der Eutergruppe zuletzt nach allen anderen Tieren statt.

3.1.1.7 Milchkühe mit Gliedmaßenkrankungen und Kühe mit hohem Lebensalter

In einem extra Abteil wurden lahme Rinder und Kühe mit hohem Lebensalter gehalten. Sie standen auf Tiefstreu im Laufstall.

Material und Methoden

3.1.2 Fütterung

Die Tiere bekamen eine Totale-Misch-Ration (TMR) mit den Hauptbestandteilen Mais- und Grassilage gefüttert. In einem Futtermittellabor wurden wöchentlich entnommene Silage-Stichproben auf ihre Zusammensetzung analysiert. Aus der individuell gemessenen Frischmasseaufnahme der Kühe und den Analysedaten konnte die Trockensubstanzaufnahme berechnet werden. In den Gruppen Vorbereiter, Frischlaktierende und in den ersten beiden Hochlaktierenden-Gruppen wurde das Futtermittel über das Wiege-Trogssystem zur Verfügung gestellt. In den anderen Haltungsabschnitten wurde die Ration auf einem Futtertisch angeboten. Zweimal am Tag wurde den Tieren das Futter verabreicht.

3.1.3 Auswahl der Probandenkühe

Die in die Untersuchung einbezogenen Milchrinder wurden anhand bestimmter vorher festgelegter Kriterien ausgewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Studientiere eine vergleichbare, nicht unter dem Herdendurchschnitt liegende Milchleistung in der Vorlaktation besaßen. Außerdem wurde die Verteilung der einbezogenen Kühe so gewählt, dass Tiere mit allen Laktationszahlen sowie Färsen beinhaltet sind. Dies gilt für beide Untersuchungszeiträume, wobei beim 2. Zeitraum weniger Rinder zugunsten von mehr Probetagen einbezogen wurden. Tabelle 13 zeigt die Verteilung der Kühe in den beiden Untersuchungszeiträumen.

Tabelle 13: Verteilung Laktationsanzahlen der Probanden

<i>Laktation</i>	1	2	3	≥4	Gesamt
<i>Anzahl Kühe im Untersuchungszeitraum 1</i>	0	27	25	57	109
<i>Anzahl Kühe im Untersuchungszeitraum 2</i>	20	23	10	30	83
<i>Gesamt</i>	20	50	35	87	192
<i>Anteil (%)</i>	10,4	26,0	18,2	45,3	100

3.1.4 Von den Untersuchungen ausgeschlossene Rinder

Rinder mit klinischen Auffälligkeiten oder anderweitigen subklinischen Störungen zu Untersuchungsbeginn wurden ausgeschlossen. Während der laufenden Studie erkrankte Tiere wurden separiert und ggf. nach Genesung wieder in ihre ursprüngliche Gruppe verbracht. Tiere mit schwerwiegenderen oder länger andauernden Erkrankungen wurden von der Studie ausgeschlossen und nicht oder nicht weiter beprobt. Des Weiteren

Material und Methoden

ausgeschlossen wurden Tiere mit Deformationen oder anderen Abnormitäten des Schwanzes, die bei der Blutentnahme Schwierigkeiten darstellten.

3.2 Probenschema und Probengewinnung

3.2.1 Futtermittelaufnahme

Die Messung der Frischmasseaufnahme in kg erfolgte für jedes Studientier mit dem Einstellen in die Vorbereitungsgruppe über das Wiege-Trogssystem automatisch. Die Daten von jeder Kuh wurden mittels Transpondererkennung zugeordnet und digital an einen Server weitergeleitet. Dort wurden die Daten gespeichert und ausgewertet. Die Messung wurde bis zum 60. Tag p.p. fortgeführt.

Die Trockensubstanz wurde fünfmal wöchentlich ermittelt. Die genaue Rationszusammensetzung der TMR wurde täglich über den mit Waage ausgestatteten Futtermittelmischwagen bei Zuladung der Einzelfuttermittel bestimmt und dann über die Futtermittelanteile die Trockensubstanz (in %) berechnet.

3.2.2 Herdendaten

Über die Herdenmanagementsoftware „Herde“ (dsp-Agrosoft GmbH) und aus den Stallbüchern konnten benötigte Daten über den Bestand wie Fruchtbarkeits-, Krankheits- und Milchleistungskontrolldaten ausgelesen und ausgewertet werden.

3.2.3 Pansenfüllung

Die Pansenfüllung wurde mit ca. 4 - 5 Stunden Abstand zur ersten Fütterung des Tages nach (Zaaijer und Noordhuizen, 2003) und (Götze, 2017) erhoben. Sie wurde stets von den gleichen Personen durchgeführt. Die Übereinstimmung der Bonitierung wurde regelmäßig kontrolliert. Die Benotung fand im jeweiligen Untersuchungszeitraum an den in Tabelle 14 folgenden Zeitpunkten statt.

Tabelle 14: Untersuchungszeitpunkte zur Beurteilung der Pansenfüllung bei den Studientieren in den jeweiligen Untersuchungszeiträumen

	<i>Untersuchungszeitpunkt in Tagen</i>					
	a.p.		p.p.			
Untersuchungszeitraum 1	-24 ± 4 ^b	1 – 9 ^a	-	28 ± 2 ^b	60 ± 2 ^b	-
Untersuchungszeitraum 2	-14 ^b , -7 – 0 ^a	1 – 7 ^a	11 – 14 ^b	28 ± 3 ^b	60 ± 2 ^b	100 ± 2 ^b

a - Untersuchung täglich 12 – 14 Uhr; b - einmalig 12 – 14 Uhr

Material und Methoden

3.2.4 Allgemeinuntersuchung

Die Allgemeinuntersuchung erfolgte nach einem festgelegten Untersuchungsplan (Tabelle 15). Ihr voraus gingen immer Anamnese und Signalement.

Tabelle 15: Zeitpunkte der Untersuchungen

	<i>Untersuchungszeitpunkt in Tagen relativ zur Kalbung</i>								
<i>Untersuchungszeitraum 1</i>	A	-21 ^b	-14 ^b	-7 ^b	0	1-5 ^c	8 ^d	28 ^e	60 ^e
<i>Untersuchungszeitraum 2</i>	-	-	-	-	1-7 ^c	13 ^d	28 ^d	60 ^d	100 ^d

A – Untersuchung am Tag der Umstellung in die Vorbereitungsgruppe, b – ± 2 Tage in Bezug auf den errechneten Kalbetermin, c – Tägliche Untersuchung, d – ± 2 Tage, e – ± 3 Tage

Es wurden neben der gängigen Allgemeinuntersuchung zusätzliche Parameter erhoben. Dazu gehören Pansenkontraktion und Test auf den Steelband-Klang, Kotkonsistenz und Kotstruktur, weiterhin Vaginalausfluss sowie Beurteilung der Vaginalschleimhaut. Die beurteilten Parameter der vorgenommenen Untersuchungen sind in Tabelle 16 aufgelistet. Der Ernährungs- und Pflegezustand und die Lymphknoten wurden auch beurteilt, jedoch nur bei Abweichungen erfasst. Zudem wurden Totgeburten erfasst und die betroffenen Kühe vermerkt.

3.2.5 Diagnosen

Über die durchgeführte weitergehende Allgemeinuntersuchung und mithilfe der Blutuntersuchung war es möglich, klinische Diagnosen zu stellen. Dabei wurden zur Diagnosestellung immer dieselben festgelegten Parameter sowie ggf. Grenzwerte verwendet. Eine genaue Definition der Diagnosen kann aus Tabelle 17 entnommen werden. Dabei richten sich die Definitionen der Diagnosen nach Götze (2017).

Material und Methoden

Tabelle 16: Erweiterte Allgemeinuntersuchung

Untersuchung	Parameter
Verhalten	o.b.B. / somnolent / komatös
Haltung	Rückenlinie, gleichmäßige Belastung der Gliedmaßen
Atemfrequenz	Atemzüge / min
Temperatur der Ohren	individuelle Einschätzung, kalt / warm / heiß
Herzfrequenz	Schläge / min
Rektaltemperatur	in °C
Lungenauskultation	Atemgeräusche, in-/ expiratorisch, Intensität
Bauchdeckenspannung	weich / mittel / fest
Lahmheit	Score 0 – 6 modifiziert nach Dirksen (2012) mit Score ≥ 2
Auffällige Besonderheiten	Stridores, Husten
Häufigkeit Pansenkontraktionen	Anzahl / min
Intensität Pansenkontraktion	Score 0 (keine) – 4 (sehr laut)
Steel-Band	vorhanden, rechts / links
Vaginalausfluss	Menge, Farbe
Vaginalschleimhaut	Feuchtigkeit Farbe, Glanz

3.2.6 Blutproben

Die Blutentnahme erfolgte am Schwanz der Tiere aus der *Ateria* oder *Vena coccygea mediana*. Zur Entnahme wurden Einmalkanülen (120 x 40 mm), ein 9ml Serum – bzw. 4ml K₃ – EDTA – Blutentnahmesystem verwendet. Im Anschluss wurden die Röhrchen mit Gerinnungshemmer 30 Sekunden lang geschwenkt. Außerdem wurde mittels eines Tropfens der EDTA-Probe, welche zuvor nochmals geschwenkt wurde, Blut auf einem Objektträger ausgestrichen. Das Anfertigen der Ausstriche geschah unter Zuhilfenahme eines anderen Objektträgers oder eines Deckgläschens. Danach wurden die Ausstriche zum Lufttrocknen ausgelegt. Der Umfang der durchgeführten Untersuchungen sind in Abhängigkeit vom Beprobungstag den nachfolgenden Tabellen zu entnehmen (Tabelle 18 und Tabelle 19).

Tabelle 17: Definition der gestellten klinischen Diagnosen

<i>Metritis/Endometritis</i>
Metritis: bis Tag 21 p.p. rot, rot – brauner, weißer Ausfluss oder weiße Flocken sowie eitriger Ausfluss mit oder ohne Fieber Endometritis: ab Tag 21 p.p. verfärbter Ausfluss
<i>Retentio secundinarum</i>
Nicht abgegangene Nachgeburt 24h p.p. (Fourichon et al., 2000)
<i>Klauenerkrankungen</i>
Nach Lahmheitsscore >1 (Dirksen, 2012) oder durch Klauenschneider diagnostiziert
<i>Stoffwechselerkrankungen</i>
Ketose: gestörtes Allgemeinbefinden in Kombination mit Pansenatonie / veränderte Kotkonsistenz / kalte Ohren; subklinisch mit BHB > 1,2 mmol/l (LeBlanc, 2010) Gebärparese: Festliegen / unsicherer Stand in den ersten 3 d p.p. und kalte Ohren Dislocatio abomasi : gestörtes Allgemeinbefinden, Anorexie / veränderte Kotkonsistenz / Steelband-Klang während der Perkussionsauskultation

3.3 Probenanalyse

Die Untersuchung der K₃ – EDTA – Vollblutproben fand im Labor der LADR GmbH – Medizinisches Versorgungszentrum Neuruppin (Untersuchungszeitraum 1) sowie im Labor der Klinik für Klauentiere der FU Berlin (Untersuchungszeitraum 2) statt. Serumproben und Blutaussstriche wurden im Labor der Klinik für Klauentiere der FU Berlin analysiert. Die Blutproben zur Serumgewinnung wurden nach 90-minütiger Ruhephase in einer Zentrifuge (Rotofix 32 A) der Firma Hettich bei 3000U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Die verwendeten Geräte und Analysemethoden für automatisiert bestimmte Parameter sind in Tabelle 20 angegeben.

Die Differenzierung der Blutaussstriche wurde mittels Mikroskops (473011-9901) der Firma Zeiss durchgeführt. Zuvor wurden die Ausstriche mit einer Pappenheim – Färbung (panoptische Färbung nach Pappenheim: Kombination aus May-Grünwald- und Giemsa-Färbung) gefärbt. Neben der Kombination von sauren und basischen Farbstoffen zur besseren Differenzierung der Zellen enthält die Färbung auch Stoffe zum Stabilisieren und Fixieren der Blutaussstriche.

Material und Methoden

Tabelle 18: Probenschema zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten

<i>Untersuchungszeitraum 1</i>			
<i>Untersuchungszeitpunkt in Tagen</i>	<i>Serumprofil groß</i>	<i>Serumprofil klein</i>	<i>K₃ – EDTA</i>
-21^a	x		
-14^a	x		x
-7	x		
0		x	
1^a		x	
2^a		x	
3^a	x		
8	x		x
28	x		x
60	x		
<i>Untersuchungszeitraum 2</i>			
<i>Untersuchungszeitpunkt in Tagen</i>	<i>Serumprofil groß</i>	<i>Serumprofil klein</i>	<i>K₃ – EDTA</i>
-14^a	x		x
1		x	
2		x	
3		x	x
11 – 14^b	x		x
28^c	x		x
60^c	x		x
100^c	x		x

a – ±2 Tage, a.p. wurden keine Färsen beprobt; b – einmalig beprobt; c – ±3d

Material und Methoden

Dies erhöht die Widerstandfähigkeit der Ausstriche gegenüber Umwelteinflüssen. Die Färbung wurde stets nach gleichem Protokoll unter einem Digestor durchgeführt: Beginnend mit einem 5-minütigen Aufenthalt der Objektträger in der May-Grünwald-Färbelösung, anschließend eine Spülung mit Aqua destillata, schließlich 18 Minuten in der Giemsa-Färbelösung und erneutem Spülen mit Aqua destillata.

Tabelle 19: Durchgeführten Analysearten

<i>Art der Analyse</i>	<i>Analyseparameter</i>
Großes Serumprofil	ASAT, GGT, GLDH, CK, Albumin, Gesamtprotein, Harnstoff, Bilirubin, Cholesterol, Glukose, BHB, NEFA, CP, Ca, P, Mg, Na, K, Cl
Kleines Serumprofil	BHB, NEFA, Ca, P, Mg
EDTA-Vollblut	Hb, HCT, RBC, WBC*

*zusätzlich zur WBC wurden die Relationen der einzelnen Leukozyten Fraktionen differenziert

Tabelle 20: Analysemethode und verwendete Geräte

<i>Analyseparameter</i>	<i>Analysegerät</i>	<i>Analysemethode</i>
EDTA-Vollblut		
Hb		Light scatter Durchflusszytometrie
Hkt		Berechnung (Hkt = MCV x RBC)
RBC		Durchflusszytometrie mit Impedanzmethode
MCV	Vet ABC – Firma Scil	Durchflusszytometrie mit Impedanzmethode
MCH		Berechnung ($\frac{Hb}{RBC} * 10$)
MCHC		Berechnung ($\frac{Hb}{RBC * MCV} * 1000$)
WBC		Durchflusszytometrie mit Impedanzmethode
Blutserum (nach Zentrifugation)		
BHB	Cobas Mira – Firma Roche	Enzymatisch ^a
NEFA		Kolorimetrisch ^a

a – Testkit von Randox Laboratories

Die Differenzierung erfolgte mit 1000facher Vergrößerung unter Verwendung von Immersionsöl. Die Leukozyten wurden eingeteilt in: Lymphozyten; Monozyten; segmentkernige, neutrophile Granulozyten; stabkernige, neutrophile Granulozyten;

Material und Methoden

eosinophile Granulozyten; basophile Granulozyten und juvenile Granulozyten. Es wurden von jedem Ausstrich 100 Zellen differenziert und die jeweiligen Anteile ermittelt. Die Differenzierung wurde nach den für das Labor üblichen Standards und nach Kraft und Dürr (1997) bzw. Kraft und Dürr (2013) durchgeführt.

3.4 Statistik

Die statistische Auswertung fand unter Zuhilfenahme der Computerprogramme Microsoft Office Excel (2016) und IBM SPSS Statistics (Version 24) für Windows statt.

Zur Prüfung auf Normalverteilung der Untersuchungsvariablen wurden die deskriptive Statistik (Histogramme) und der Shapiro-Wilk-Test mit dem festgelegten Signifikanzniveau von 0,05 verwendet. Die deskriptive Statistik wurde außerdem zur Überprüfung der Daten auf Plausibilität genutzt.

Aus den im Labor ermittelten Werten für die Gesamtleukozyten (WBC, in Gpt/l) und Anteil der jeweiligen differenzierten Leukozytenfraktionen (in %) wurden absolute Werte (in Gpt/l) für die einzelnen Fraktionen berechnet.

3.4.1 Gemischte Modelle

Unter Verwendung des verallgemeinerten, linearen, gemischten Modells wurde untersucht, ob das Laktationsstadium der Studienkühe einen Einfluss auf die als normalverteilt angenommenen Parameter (Tabelle 21) besitzen. Die Mittelwerte wurden geschätzt und paarweise verglichen, außerdem erfolgte eine Bonferroni-Korrektur.

Dies wurde für jeden Beprobungszeitpunkt durchgeführt. Dabei wurden das individuelle Studientier und das Beprobungsjahr als zufälliger Effekt angenommen. Der Beprobungszeitpunkt in der Laktation wurde als fester Effekt gewählt. Für die nicht als normal verteilt angenommenen Variablen wurde selbiges Modell mit zusätzlicher Gammaregression verwendet. Die Werte für die Parameter basophile und juvenile Granulozyten wurden aufgrund mangelnder Variabilität nicht mit genutzt.

Tabelle 21: Angenommene Verteilung und verwendetes Modell für die einzelnen Blutwerte der Leukozyten zusammengefasst für alle Beprobungszeitpunkte

<i>Parameter</i>	<i>Angenommene Verteilung</i>	<i>Verwendetes statistisches Modell</i>
WBC	Gaußsche Normalverteilung	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell
Anteil Lymphozyten	Gaußsche Normalverteilung	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell
Anteil Monozyten	Nicht normal verteilt	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Gammaregression
Anteil segmentkernige neutrophile Granulozyten	Gaußsche Normalverteilung*	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell
Anteil stabkernige neutrophile Granulozyten	Nicht normal verteilt	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Gammaregression
Anteil eosinophiler Granulozyten	Nicht normal verteilt	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Gammaregression
Absolute Anzahl Lymphozyten	Gaußsche Normalverteilung	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell
Absolute Anzahl Monozyten	Nicht normal verteilt	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Gammaregression ^a
Absolute Anzahl segmentkernige neutrophile Granulozyten	Gaußsche Normalverteilung*	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell
Absolute Anzahl stabkernige neutrophile Granulozyten	Nicht normal verteilt	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Gammaregression ^a
Absolute Anzahl eosinophile Granulozyten	Nicht normal verteilt	verallgemeinertes lineares gemischtes Modell mit Gammaregression ^a

*Normalverteilung wurde auch angenommen, wenn Parameter nicht an allen, aber für die Mehrzahl der Beprobungstage nach Shapiro-Wilk normalverteilt waren; a – für diese Parameter wurde eine neu erstellte Variable verwendet, wobei zu jedem Wert 1 addiert wurde

Die jeweiligen Parameter wurden für die verschiedenen Zeitpunkte in Box Plots gegenübergestellt. Unterschiede zwischen den Zeitpunkten werden durch Buchstaben gekennzeichnet. Verschiedene Buchstaben weisen auf signifikante Unterschiede auf dem Niveau $< 0,05$ hin. Der „gesamt-p-Wert“ in den Diagrammen spiegelt den generellen Einfluss der Untersuchungstage auf den jeweiligen Parameter wider. Einen Überblick über die Signifikanzniveaus gibt Tabelle 22.

Tabelle 22: Einteilung des Signifikanzniveaus anhand der p-Werte

<i>p- Wert</i>	<i>Einteilung des Signifikanzniveaus nach Petrie und Watson (2006)</i>
$p < 0,001$	höchst signifikant
$0,001 < p < 0,01$	hoch signifikant
$0,01 < p < 0,05$	signifikant
$P > 0,05$	Nicht signifikant

3.4.2 Referenzwerte

Für die einzelnen absoluten und relativen Leukozyten sowie für die WBC wurden Referenzwerte erstellt. In Abhängigkeit der Verteilung erfolgte die Berechnung von parametrischen und nicht parametrischen Werten. Die Referenzwerte wurden für jedes Laktationsstadium einzeln ermittelt. Falls zwischen den Werten der einzelnen Laktationsstadien kein signifikanter Unterschied bestand, wurden mehrere Stadien zu Gruppen zusammengefasst. Die Berechnung der parametrischen Grenzwerte erfolgte mit der Formel: $\bar{x} \pm 1,96 * s$. Die nicht parametrischen Grenzwerte beruhen auf dem Intervall zwischen dem 2,5- und 97,5-Perzentil.

3.4.3 Korrelationen

Für alle ermittelten Werte der weißen Blutzellen wurden Korrelationen mittels Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten mit Trockensubstanzaufnahme, Pansenfüllung, BHB und NEFA errechnet. Der Koeffizient r besitzt einen Definitionsbereich von -1 bis 1, wobei negative Werte negative Korrelationen und positive Werte positive Korrelationen angeben. Für $r = 0$ besteht keine Korrelation. Die Einteilung der Korrelationsstärke (Tabelle 23) erfolgte nach Bühl (2014).

Tabelle 23: Einteilung der Korrelation in Abhängigkeit von r

<i>Korrelationskoeffizient r</i>	<i>Einteilung der Korrelation nach Bühl (2014)</i>
<i>Bis 0,2</i>	<i>sehr gering</i>
<i>Bis 0,5</i>	<i>gering</i>
<i>Bis 0,7</i>	<i>mittel</i>
<i>Bis 0,9</i>	<i>hoch</i>
<i>Über 0,9</i>	<i>sehr hoch</i>

3.4.4 Regressionsanalyse, Mann-Whitney-U- und t-Test

Um Zusammenhänge zwischen dem Differentialblutbild und bestimmten Erkrankungen (Klauen-, Stoffwechselerkrankungen, Fruchtbarkeitsstörungen) darzustellen, wurden logistische Regressionsanalysen durchgeführt. Gleiches erfolgte für die WBC – Werte und die genannten Erkrankungen. Logistische Regressionen wurden außerdem verwendet, um Zusammenhänge zwischen dem Differentialblutbild 14d a.p. und Nachgeburtsverhalten sowie Totgeburten zu ermitteln. Zur besseren Interpretation wurden neben den Regressionskoeffizienten B die Odds Ratio und Signifikanz mit angegeben. Statistische signifikante Zusammenhänge basieren auf einem Niveau $p < 0,05$. Diese wurden mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

Mittels Mann-Whitney-U-Test (zweiseitig) für nicht normalverteilte oder t-Test für normal verteilte Parameter wurde der Einfluss von Nachgeburtsverhaltung sowie Totgeburten auf das Differentialblutbild und die Gesamtanzahl an WBC für den postpartalen Zeitraum ermittelt. Bei Variablen, welche mittels t-Tests berechnet wurden, erfolgte dessen Auswertung unter Zuhilfenahme von Levene – Tests auf Varianzgleichheit.

Mit den genannten statistischen Tests berechnete signifikante Einflüsse beruhen auf dem Niveau $< 0,05$. Jene wurden ebenfalls mit unterschiedlichen Buchstaben gekennzeichnet.

3.4.5 Variationskoeffizient

Als Überprüfung des manuellen Differenzierens der Blutausrichthe fand die Bestimmung von Variationskoeffizienten innerhalb eines Präparates statt. Dafür wurde ein zufällig ausgewähltes Präparat an zehn verschiedenen Tagen zehnmal differenziert. Ermittelt wurden Intraday- sowie Interday-Variationskoeffizienten. Zusätzlich wurden 10 zufällig ausgewählte Präparate an drei verschiedenen Tagen zehnmal differenziert und erneut Variationskoeffizienten bestimmt.

Material und Methoden

Um die Präzision bzw. die Reproduzierbarkeit der mikroskopischen Differenzierung von Leukozyten in Rinderblutausstrichen zu untersuchen, wurden zufällig ausgewählte Präparate mehrmals differenziert. Dabei wurde zwischen 1 Präparat, welches mehrmals am selben Tag (Intraday – Variationskoeffizient) sowie zusätzlich an 10 verschiedenen Tagen (Interday – Variationskoeffizient) differenziert wurde, unterschieden. Darüber hinaus wurden 10 verschiedene Präparate, welche innerhalb von 3 Differenzierungsdurchgängen untersucht wurden (Intraday – Variationskoeffizient), mit betrachtet. Die Berechnung der Kennzahlen Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient erfolgte für Lymphozyten, segmentkernige neutrophile und eosinophile Granulozyten. Für Monozyten, stabkernige neutrophile Granulozyten und basophile Granulozyten ist die Berechnung eines Variationskoeffizienten nicht zulässig. Für den besseren Vergleich mit in der Literatur publizierten Werten erfolgte dennoch eine Berechnung und die entsprechenden Koeffizienten wurden in Klammern gesetzt. Sie sind in Tabellen im Anhang zu finden. Zur Berechnung wurden Mittelwert und Standardabweichung bestimmt. Die Berechnung des VKs erfolgte nach der Formel: $\text{Variationskoeffizient} = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}$.

4 Ergebnisse

4.1 Methodischer Fehler

4.1.1 Interday – und Intraday – Variationskoeffizienten in einem Präparat

Ein zufällig ausgewähltes Präparat wurde an zehn verschiedenen Tagen zehnmal differenziert und ein Interday- sowie zehn Intraday-Variationskoeffizienten bestimmt. In Tabelle 24 bis Tabelle 26 sind die Intraday-VK inklusiver M und SD für die jeweils einzelnen Fraktionen (Lymphozyten, segmentkernige und eosinophile Granulozyten) abgebildet, zusätzlich erfolgte die Gegenüberstellung der Interday-VK inklusiver M und SD. Basophile und juvenile Granulozyten kamen in dem Präparat nicht vor. Stabkernige Granulozyten und Monozyten wurden selten gefunden, sodass keine aussagekräftigen Variationskoeffizient berechnet werden konnte (Division durch 0). Das genutzte Verfahren eignet sich somit schlecht für kleine Zahlen bzw. für Zellen die kaum und teilweise gar nicht vorkommen. Trotzdem befinden sich der Vollständigkeit halber im Anhang entsprechende Tabellen.

Ergebnisse

4.1.2 Intra- und Interday Variationskoeffizienten

Tabelle 24: Methodische Fehler bei der Differenzierung der Lymphozyten

												<i>Intraday</i>		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SD	M	VK
Messung	Tag													
	1	52	53	47	60	55	53	59	55	52	56	3,736	54,200	0,069
	2	55	48	52	56	53	52	53	50	53	55	2,406	52,700	0,046
	3	59	54	51	53	50	49	56	55	53	52	2,974	53,200	0,056
	4	54	57	53	55	51	56	49	52	53	56	2,503	53,600	0,047
	5	53	52	50	57	58	54	53	53	51	56	2,584	53,700	0,051
	6	51	46	54	50	44	49	56	58	57	53	4,662	51,800	0,090
	7	48	49	46	48	57	59	50	51	51	49	4,104	50,800	0,081
	8	50	56	58	57	52	56	53	51	57	54	2,797	54,400	0,051
	9	45	48	53	51	54	55	52	48	50	51	3,057	50,700	0,060
	10	56	49	49	48	54	51	54	51	53	52	2,584	51,700	0,050
<i>Interday</i>	SD	4,06	3,74	3,53	4,14	3,97	3,24	2,95	2,91	2,36	2,41	M	52,70	0,060
	M	52,3	51,2	51,3	53,5	52,8	53,4	53,5	52,4	53,0	53,4	M	52,7	
	VK	0,078	0,073	0,069	0,077	0,075	0,061	0,055	0,056	0,044	0,045		0,063	

SD – Standardabweichung, M – Mittelwert, VK – Variationskoeffizient

Ergebnisse

Tabelle 25: Methodische Fehler bei der Differenzierung der segmentkernigen Granulozyten

												<i>Intraday</i>			
Messung		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SD	M	VK	
Tag															
	1	44	44	49	36	41	46	37	41	46	39	4,218	42,300	0,100	
	2	42	49	45	40	43	44	44	46	44	41	2,573	43,800	0,059	
	3	40	42	46	44	45	47	40	41	45	45	2,550	43,500	0,059	
	4	42	41	43	42	46	41	47	43	41	42	2,098	42,800	0,049	
	5	42	41	47	41	41	42	44	43	44	41	1,955	42,600	0,048	
	6	45	50	42	47	52	48	40	38	41	44	4,547	44,700	0,102	
	7	47	47	50	49	41	37	48	45	45	48	3,974	45,700	0,087	
	8	46	39	38	40	45	40	43	46	39	42	3,048	41,800	0,073	
	9	51	48	43	44	41	40	44	49	46	45	3,479	45,100	0,077	
	10	40	48	49	49	41	46	41	45	43	45	3,368	44,700	0,075	
<i>Interday</i>	SD	3,45	3,96	3,77	4,24	3,57	3,64	3,36	3,16	2,37	2,66		M	43,7	0,073
	M	43,9	44,9	45,2	43,2	43,6	43,1	42,8	43,7	43,4	43,2		M	43,7	
	VK	0,079	0,088	0,083	0,098	0,082	0,084	0,079	0,072	0,055	0,062			0,078	

SD – Standardabweichung, M – Mittelwert, VK – Varationskoeffizient

Ergebnisse

Tabelle 26: Methodische Fehler bei der Differenzierung der eosinophilen Granulozyten

												<i>Intraday</i>			
Messung		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SD	M	VK	
Tag															
	1	4	3	4	4	4	1	4	4	2	5	1,179	3,500	0,337	
	2	3	3	3	4	4	4	3	4	3	4	0,527	3,500	0,151	
	3	1	4	3	3	5	4	3	4	2	3	1,135	3,200	0,355	
	4	4	2	4	3	3	3	4	5	6	2	1,265	3,600	0,351	
	5	5	7	3	2	1	4	3	4	5	3	1,703	3,700	0,489	
	6	4	4	4	3	4	3	3	4	2	3	0,699	3,400	0,206	
	7	4	4	4	3	2	3	2	4	4	3	0,823	3,300	0,249	
	8	4	5	4	3	3	4	4	3	4	4	0,632	3,800	0,166	
	9	3	4	4	4	5	5	4	3	4	4	0,667	4,000	0,167	
	10	4	3	2	3	4	3	4	4	4	3	0,699	3,400	0,206	
<i>Interday</i>	SD	1,08	1,37	0,71	0,63	1,27	1,08	0,7	0,57	1,35	0,84		M	3,5	0,268
	M	3,6	3,9	3,5	3,2	3,5	3,4	3,4	3,9	3,6	3,4		M	3,5	
	VK	0,299	0,351	0,202	0,198	0,363	0,316	0,206	0,146	0,375	0,248			0,270	

SD – Standardabweichung, M – Mittelwert, VK – Varationskoeffizient

Ergebnisse

4.1.3 Intraday – Variationskoeffizienten in zehn verschiedenen Präparaten

Zur Untersuchung der Variation zwischen verschiedenen Präparaten wurden zehn verschiedene Präparate an drei verschiedenen Untersuchungsdurchgängen jeweils zehnmal differenziert. Es folgte die Berechnung der jeweiligen Intraday-VK sowie deren Mittelwert für jedes der zehn Präparate. Diese sind nachfolgend in Tabelle 27 bis Tabelle 29 dargestellt. Zusätzlich wurden in den Tabellen die Mittelwerte der jeweils dargestellten Leukozyten für jedes Präparat mit angegeben.

Des Weiteren finden sich im Anhang B die einzelnen Variationskoeffizienten der jeweiligen Leukozyten für alle 10 Präparate und Differenzierungsdurchgang getrennt (Tabelle 66, Tabelle 67 und Tabelle 68).

Tabelle 27: Intraday-Fehler (Variationskoeffizienten) an 3 Tagen für die Lymphozyten

<i>Präparat</i>	<i>Mittelwerte (in%)</i>	<i>VK</i>			<i>Mittelwerte der VK</i>
		<i>Tag 1</i>	<i>Tag 2</i>	<i>Tag 3</i>	
1	36,1	0,121	0,085	0,068	0,091
2	33,5	0,112	0,144	0,102	0,119
3	16,9	0,259	0,175	0,148	0,194
4	13,2	0,195	0,132	0,138	0,155
5	55,8	0,084	0,056	0,056	0,065
6	19,5	0,129	0,157	0,129	0,138
7	69,9	0,080	0,058	0,056	0,064
8	29,4	0,067	0,095	0,129	0,097
9	44,3	0,093	0,104	0,080	0,092
10	37,0	0,055	0,097	0,085	0,079
Gesamtmittelwert					0,110

Ergebnisse

Tabelle 28: Intraday-Fehler (Variationskoeffizienten) an 3 Tagen für segmentierte neutrophile Granulozyten

<i>Präparat</i>	<i>Mittelwerte (in%)</i>	<i>VK</i>			<i>Mittelwerte der VK</i>
		<i>Tag 1</i>	<i>Tag 2</i>	<i>Tag 3</i>	
1	60,1	0,078	0,068	0,042	0,063
2	62,6	0,065	0,056	0,041	0,054
3	81,5	0,056	0,029	0,029	0,038
4	82,0	0,038	0,036	0,029	0,035
5	42,2	0,115	0,066	0,080	0,087
6	65,0	0,129	0,033	0,040	0,067
7	24,5	0,197	0,166	0,174	0,179
8	66,5	0,021	0,049	0,061	0,044
9	53,9	0,074	0,069	0,063	0,069
10	56,5	0,019	0,062	0,070	0,051
Gesamtmittelwert					0,069

Ergebnisse

Tabelle 29: Intraday-Fehler (Variationskoeffizienten) an 3 Tagen für eosinophile Granulozyten

<i>Präparat</i>	<i>Mittelwerte (in%)</i>	<i>VK</i>			<i>Mittelwerte der VK</i>
		<i>Tag 1</i>	<i>Tag 2</i>	<i>Tag 3</i>	
1	3,1	0,515	0,351	0,418	0,428
2	3,6	0,471	0,547	0,408	0,476
3	0,7	1,610	1,176	1,000	1,262
4	0,2	-	2,108	1,610	-
5	0,1	-	-	2,108	-
6	0,6	1,291	1,414	1,291	1,332
7	4,8	0,235	0,225	0,311	0,257
8	3,6	0,316	0,383	0,346	0,349
9	1,3	0,787	0,791	0,602	0,727
10	6,2	0,199	0,302	0,304	0,268
Gesamtmittelwert					0,637

4.2 Laktationsverlauf

In Abbildung 1 bis Abbildung 11 sind die Leukozyten zu den jeweiligen Laktationsabschnitten mithilfe von Boxplots dargestellt. Verschiedene Buchstaben (a, b) zeigen signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen auf dem Niveau $p < 0,05$. Diese wurden mittels des verallgemeinerten linearen gemischten Modells ermittelt. Die Zahlen in den Boxen kennzeichnen die Anzahl (N) der getesteten Milchkühe an den jeweiligen Untersuchungstagen. Eine Beeinflussung des Laktationsabschnittes auf die jeweiligen Werte der Leukozyten ist ebenfalls getestet worden und wird vom p-Wert in den Diagrammen widerspiegelt.

4.2.1 WBC

In Abbildung 1 ist die Gesamtanzahl der Leukozyten zu den jeweiligen Laktationsabschnitten dokumentiert. Die absolute Zahl der Leukozyten an den Beprobungszeitpunkten ist unterschiedlich voneinander. Diese Unterschiede sind höchst signifikant ($p < 0,001$), folglich hat das Laktationsstadium bzw. der Beprobungszeitpunkt einen Einfluss auf die WBC. Zudem weisen die Kühe 14d a.p. und 28d p.p. numerisch betrachtet niedrige Werte auf, wohingegen 3d und 8d p.p. ein Anstieg bei den Milchrindern sichtbar wird, welcher sich

Ergebnisse

signifikant höher gegenüber 28d p.p. darstellt. Jedoch scheint 3d p.p. die Streuung der Werte deutlich größer zu sein. Im Vergleich mit den von Moritz et al. (2013a) publizierten Referenzintervall wird deutlich, das Median und drittes Quartil aller Beprobungstage innerhalb der Referenzlimits liegen. Jedoch befindet sich das erste Quartil des Beprobungstages 3d p.p. als einziges außerhalb des Intervalls.

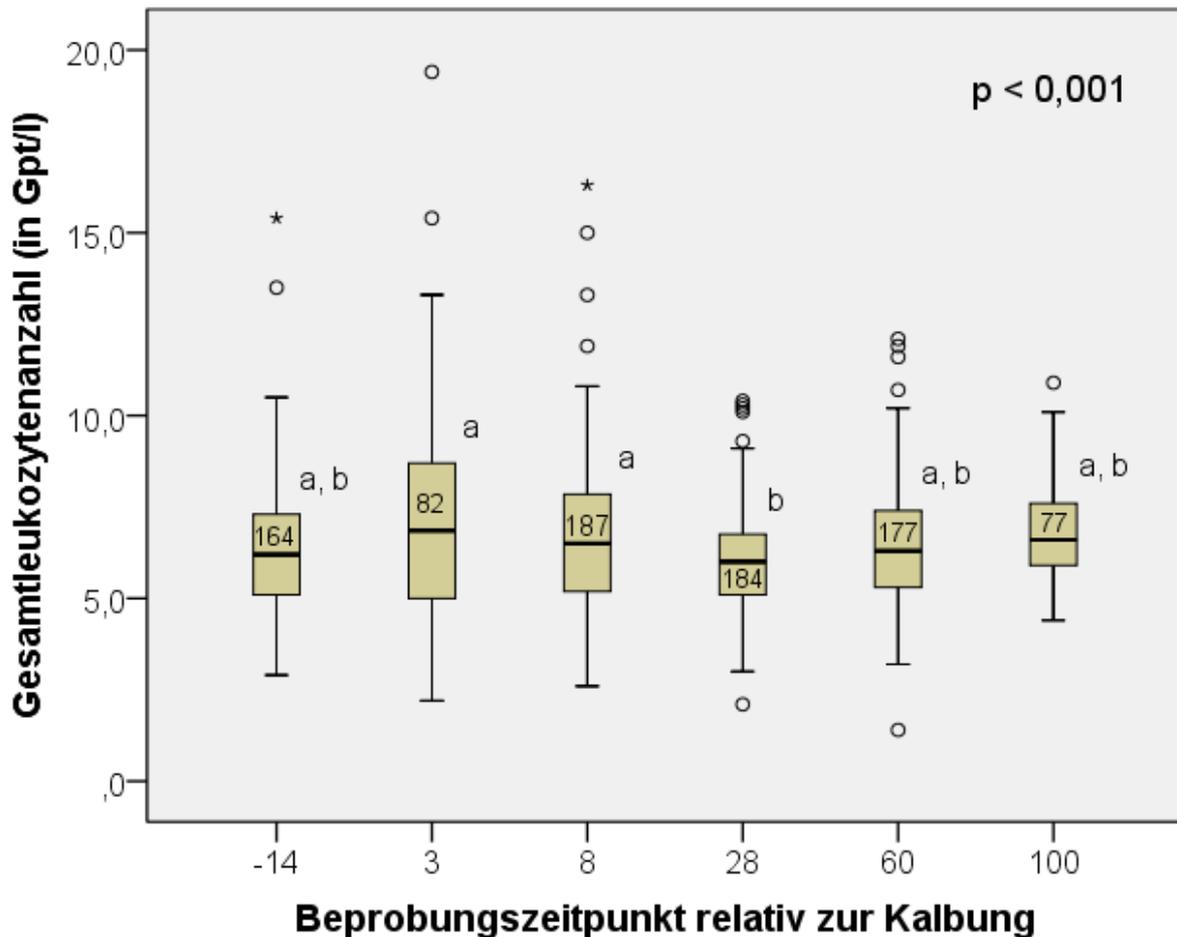


Abbildung 1: WBC (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

4.2.2 Lymphozyten

In Abbildung 2 ist der prozentuale Anteil der Lymphozyten (Lymph) an den jeweiligen Laktationsstadien aufgelistet. Insgesamt lässt sich ein Einfluss der Beprobungszeitpunkte erkennen, die Werte an den unterschiedlichen Tagen unterscheiden sich signifikant. Gleiche Buchstaben (a) weisen jedoch darauf hin, dass mittels post-hoc-Test keine Unterschiede im Vergleich der einzelnen Tage untereinander ermittelt werden konnten. Darüber hinaus liegen alle Medianwerte sowie erstes, mit Ausnahme 8d p.p. und drittes Quartil innerhalb des in Deutschland üblichen Referenzintervalls von Moritz et al. (2013a). Jedoch ist in einer rein numerischen Betrachtung ein Anstieg der Lymphozyten zur Kalbung zu erkennen. Gleiches

Ergebnisse

gilt für die absolute Anzahl an Lymphozyten (Abbildung 3). Ein hoch signifikanter Unterschied zwischen der Anzahl der Lymphozyten an den jeweiligen Laktationsstadien auf dem Niveau $p < 0,01$ ist erkennbar. Gleiche Buchstaben (a) zeigen erneut an, dass keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Tagen untereinander vorhanden sind. Des Weiteren liegen alle Medianwerte sowie erstes und drittes Quartil zwischen den üblichen, in Deutschland Anwendung findenden Referenzlimits von Moritz et al. (2013a). Einzige Ausnahme ist das erste Quartil 14d a.p.

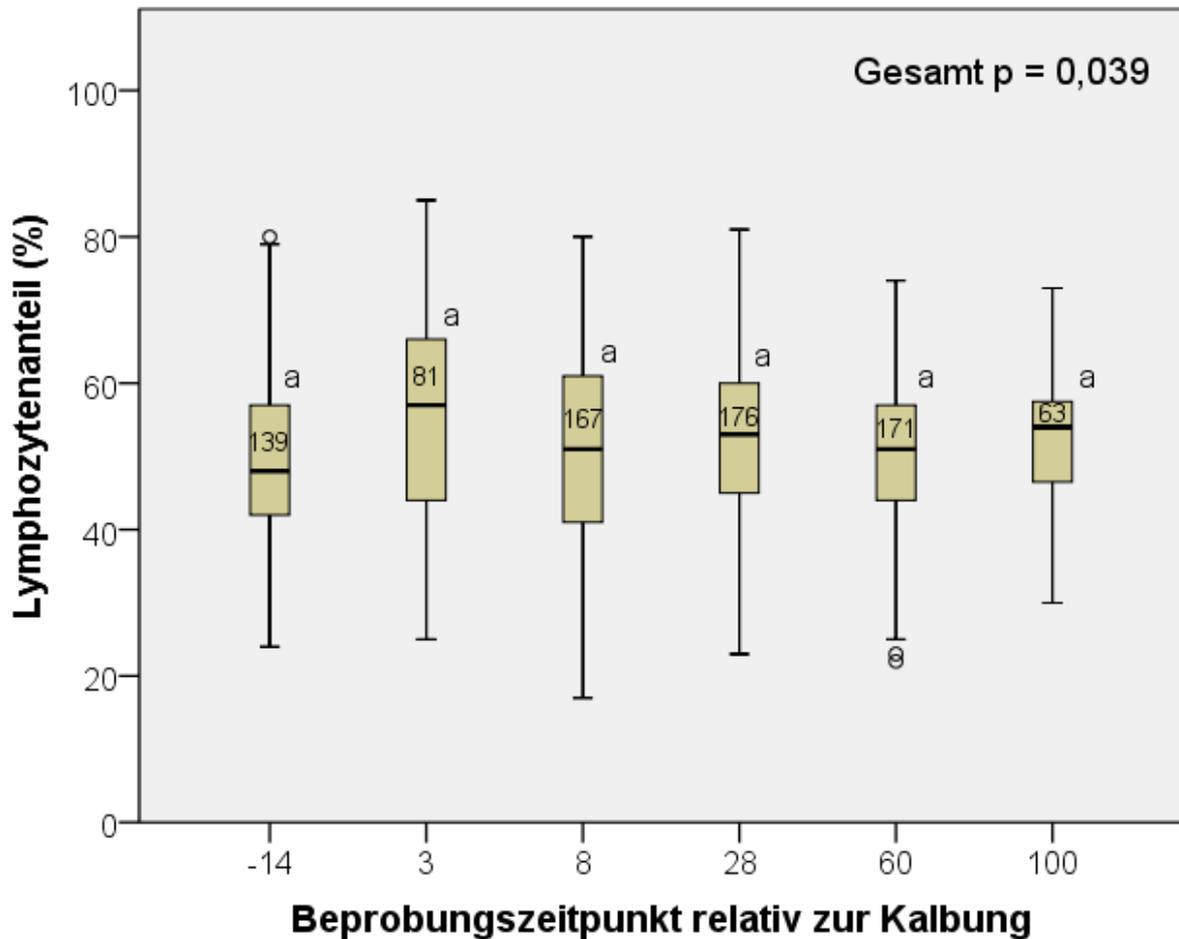


Abbildung 2: Lymphozytenanteil (in %) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Ergebnisse

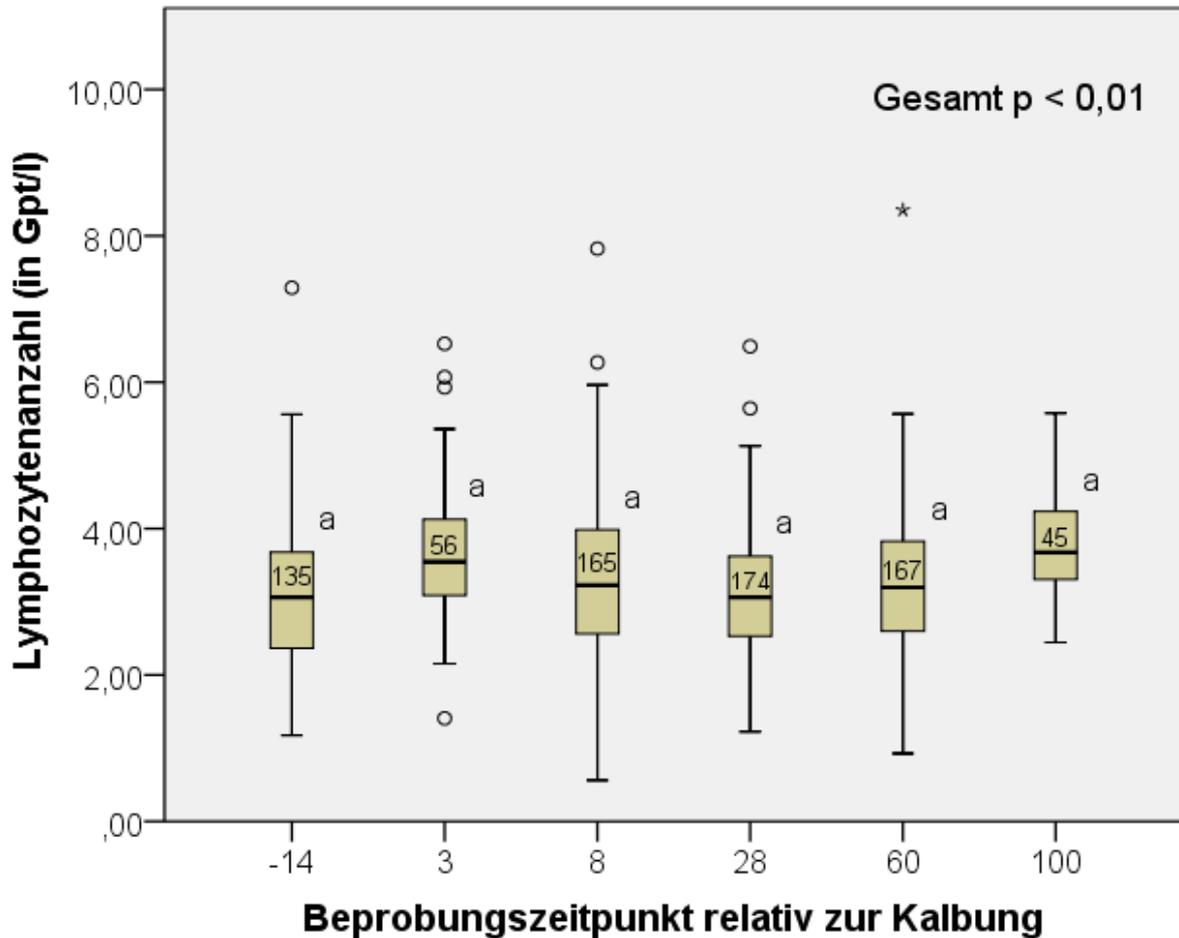


Abbildung 3: Lymphozytenanzahl (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

4.2.3 Monozyten

In Abbildung 4 ist der prozentuale Anteil der Monozyten (Mono) im Laktationsverlauf dargestellt. Ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Beprobungstagen verdeutlicht den Einfluss des Laktationsabschnittes auf die Monozytenwerte. Die Monozyten 3d p.p. unterscheiden sich im post-hoc Test von allen anderen Laktationszeitpunkten (mit Ausnahme 100d p.p.) signifikant und erscheinen größer, was auf einen Anstieg der Monozyten zur Kalbung oder unmittelbar p.p. hinweist.

In Abbildung 5 ist die absolute Anzahl an Monozyten im Laktationsverlauf aufgelistet. Es besteht ein höchst signifikanter Zusammenhang zwischen Laktationsstadium und absoluten Monozytenwerten. Die verschiedenen Buchstaben (a, b) kennzeichnen signifikante Unterschiede, welche vor allem 3d und 8d p.p. bestehen. Auch hier verzeichnen die Werte einen Anstieg gegenüber den anderen Beprobungstagen unmittelbar nach der Kalbung. Sowohl bei den relativen, als auch absoluten Monozytenwerten liegen die Medianwerte sowie erstes und drittes Quartil an allen Tagen innerhalb des üblichen

Ergebnisse

Referenzintervalls (Moritz et al., 2013a). Darüber hinaus befinden sich die Werte an allen Zeitpunkten im unteren Bereich des Intervalls.

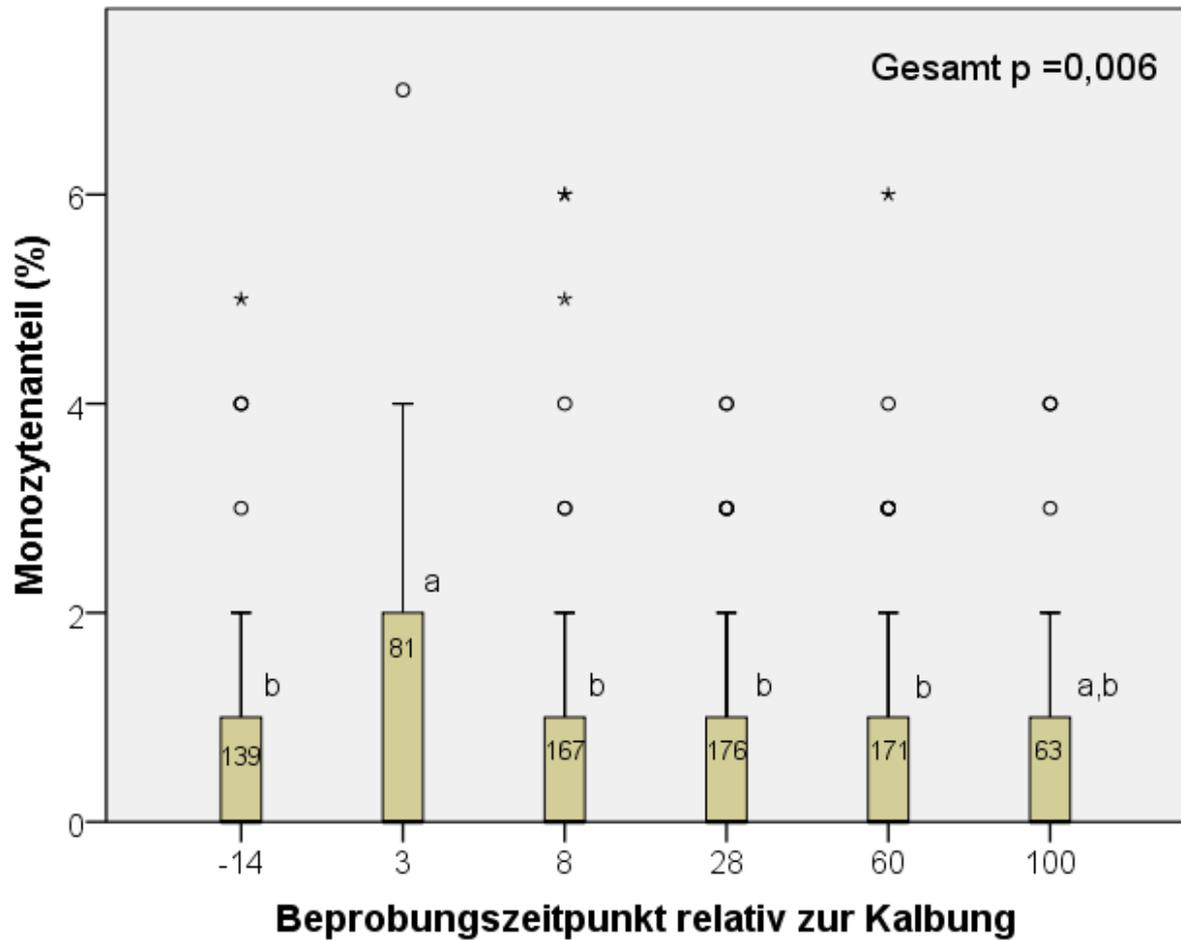


Abbildung 4: Monozytenanteil (in %) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Ergebnisse

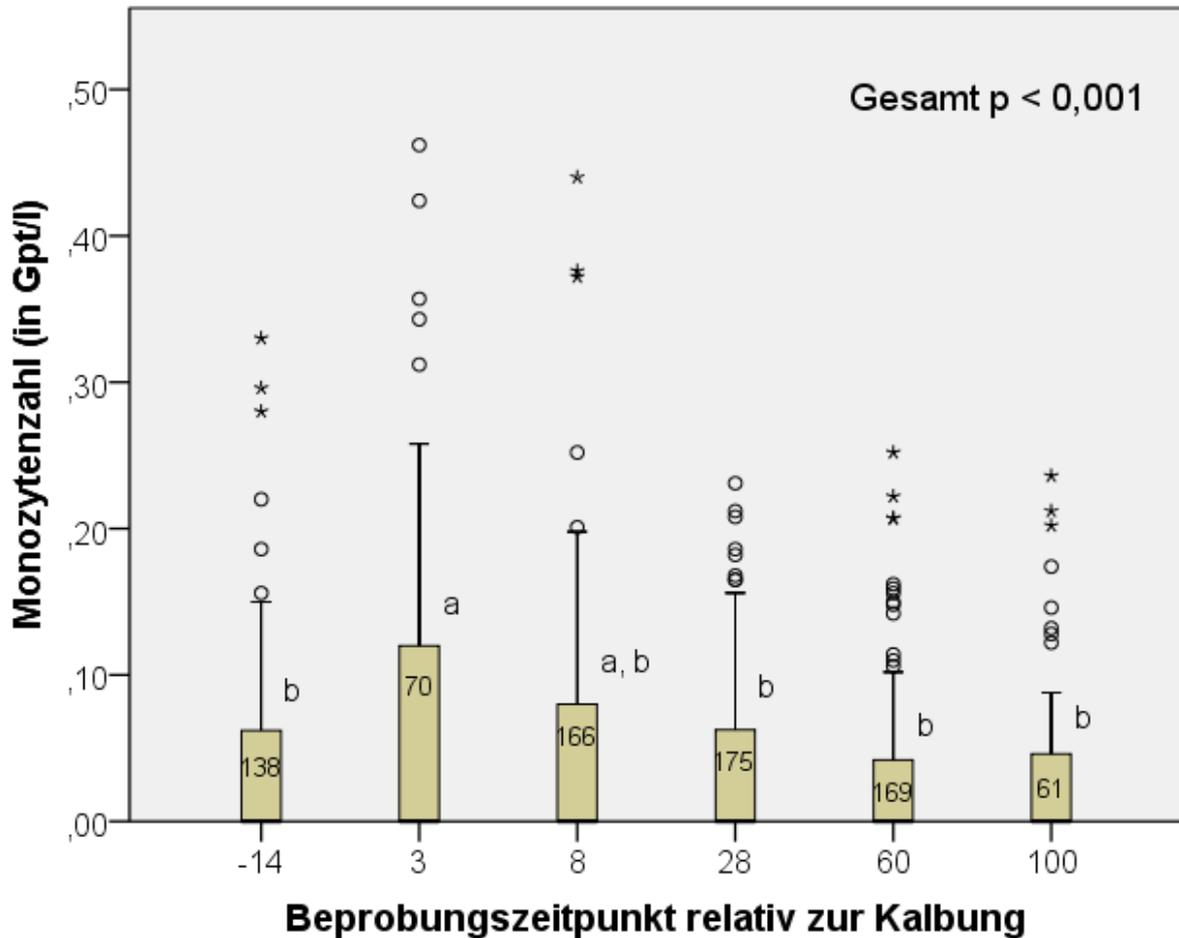


Abbildung 5: Monozytenanzahl (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

4.2.4 Segmentkernige Granulozyten

Der Anteil der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (SeG) an den WBC ist für die verschiedenen Tage in Abbildung 6 dargestellt. Es besteht ein signifikanter Unterschied und damit ein Einfluss des Laktationsstadiums auf die segmentkernigen Neutrophilen.

Außerdem unterscheiden sich die Werte 3d p.p. signifikant von allen anderen Tagen und erscheinen niedriger. Diese Beobachtungen sind bei den absoluten Werten kaum zu erkennen (Abbildung 7).

In einer vergleichenden Betrachtung zu den in Deutschland üblicherweise herangezogenen Referenzintervall (Moritz et al., 2013a) fällt auf, dass das dritte Quartil der relativen Werte von allen Beprobungstagen über dem oberen Referenzlimit liegt. Die ersten Quartile und Medianwerte allerdings befinden sich zu allen Zeitpunkten im Referenzintervall. Bei den absoluten Werten hingegen liegen die meisten noch knapp im Intervall, nur 3d und 8d p.p. liegen, wahrscheinlich aufgrund ihrer größeren Streuung, darüber.

Ergebnisse

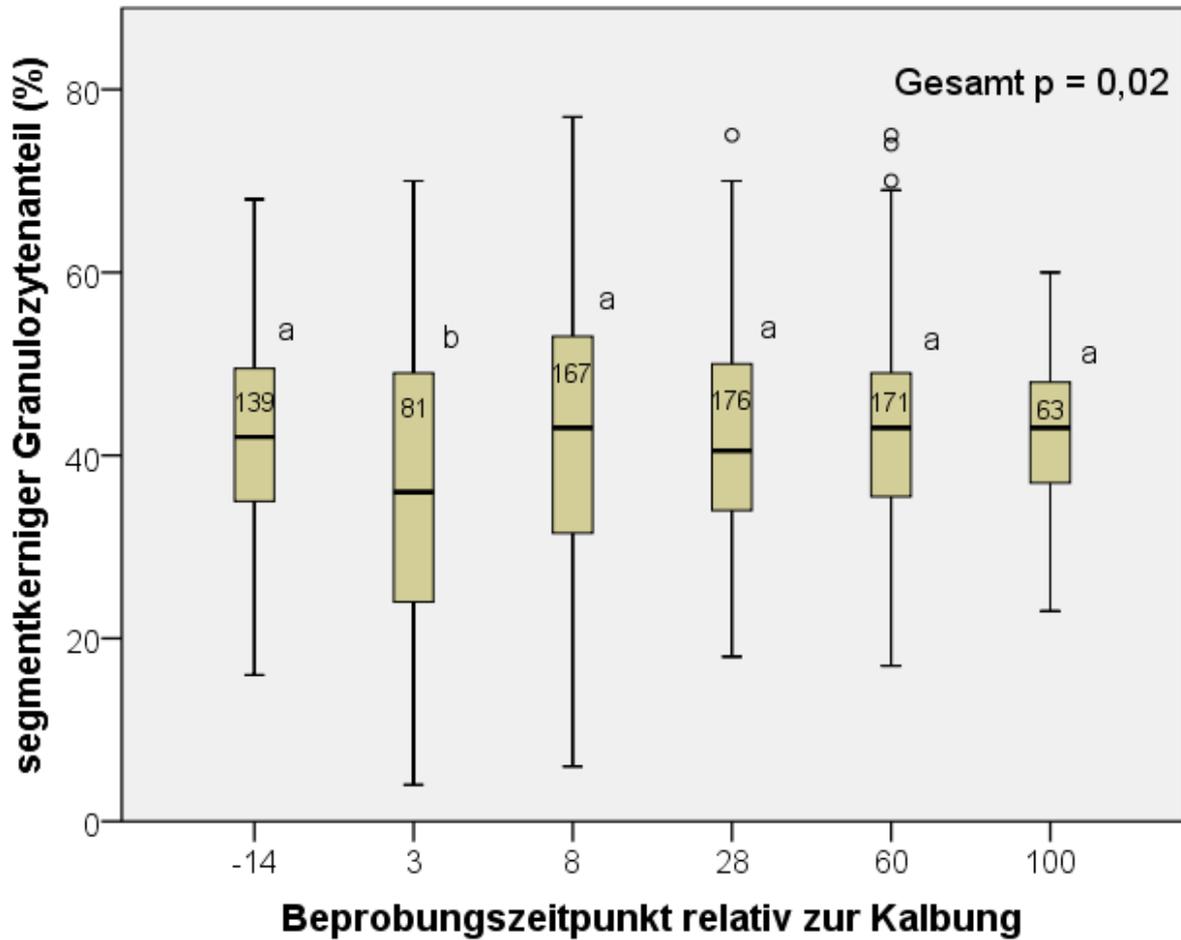


Abbildung 6: Segmentkerniger Granulozytenanteil (in %) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Ergebnisse

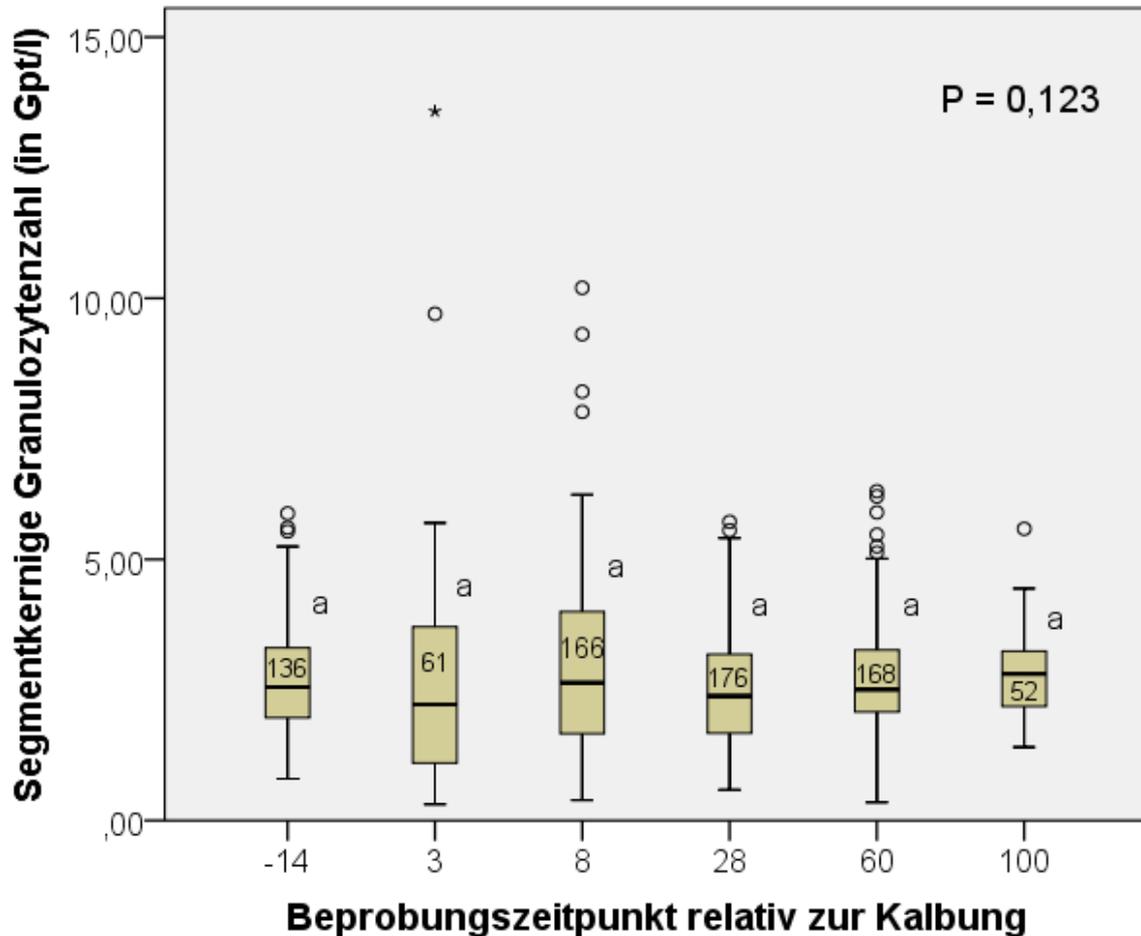


Abbildung 7: Segmentkernige Granulozytenanzahl (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

4.2.5 Stabkernige Granulozyten

In Abbildung 8 ist der prozentuale Anteil der stabkernigen neutrophilen Granulozyten (StaG) an den Leukozyten im Laktationsverlauf dargestellt. Der Laktationsabschnitt besitzt einen höchst signifikanten Einfluss auf die stabkernigen Neutrophilen und es zeigt sich eine auffällige Dynamik.

Verschiedenen Buchstaben (a, b, c) verdeutlichen signifikante Unterschiede im post-hoc Test. Die antepartal besonders niedrigen Werte erreichen postpartal, insbesondere 3d und 8d p.p., ihre Höhepunkte, um allmählich bis 100d p.p. wieder auf einen Tiefpunkt zu sinken. Die stabkernigen Neutrophilen 100d p.p. unterscheiden sich im post-hoc Test jedoch nicht von denen, die 14d a.p. ermittelt wurden.

Dieses Verhalten zeigt sich auch in Abbildung 9 anhand der absoluten Werte der stabkernigen neutrophilen Granulozyten. Der Laktationsabschnitte besitzt ebenfalls einen höchst signifikanten Einfluss auf die absoluten Werte und es stellt sich selbige Dynamik dar. Bei relativen und absoluten Werten befindet sich das 3. Quartil 3d und 8d p.p. über den üblichen Referenzintervall (Moritz et al., 2013a).

Ergebnisse

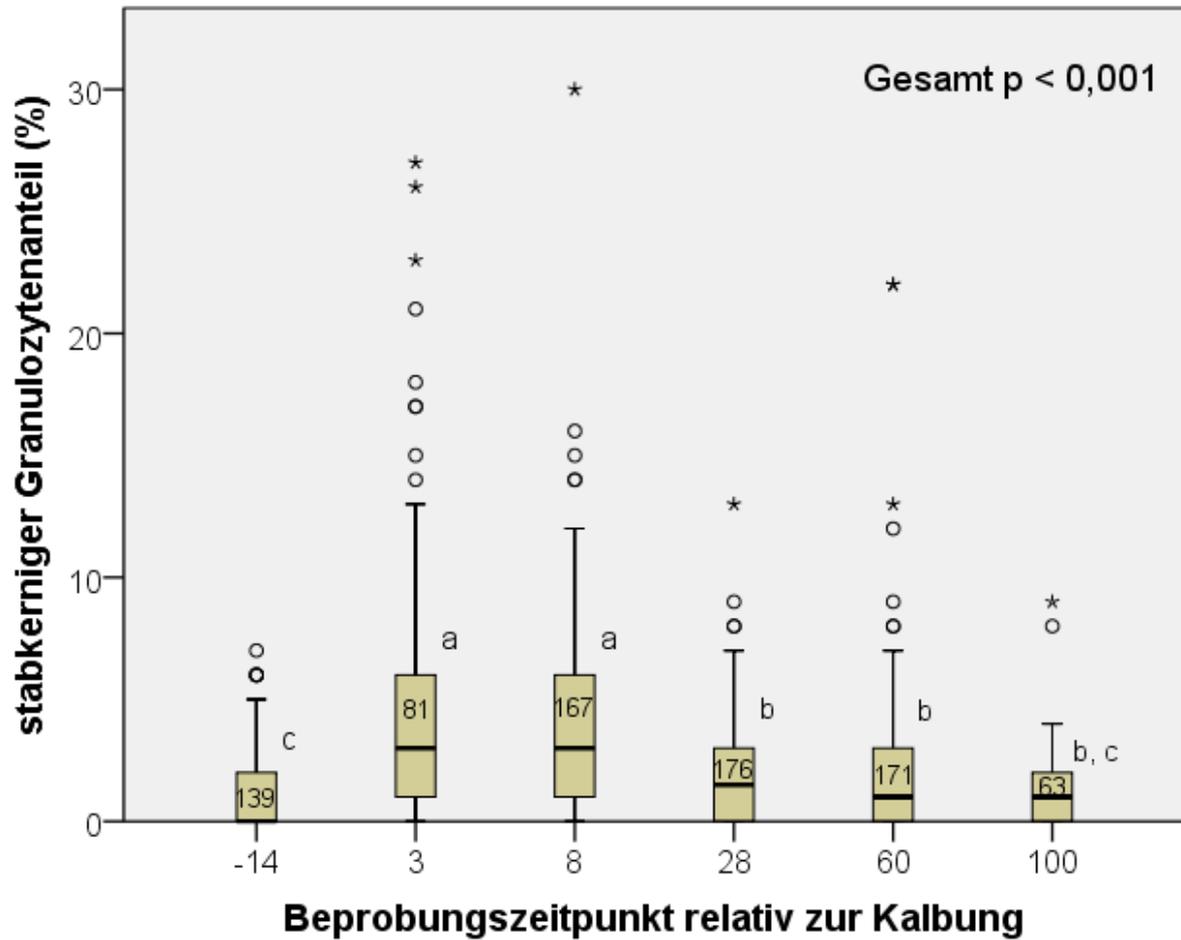


Abbildung 8: Stabkerniger Granulozytenanteil (in %) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Ergebnisse

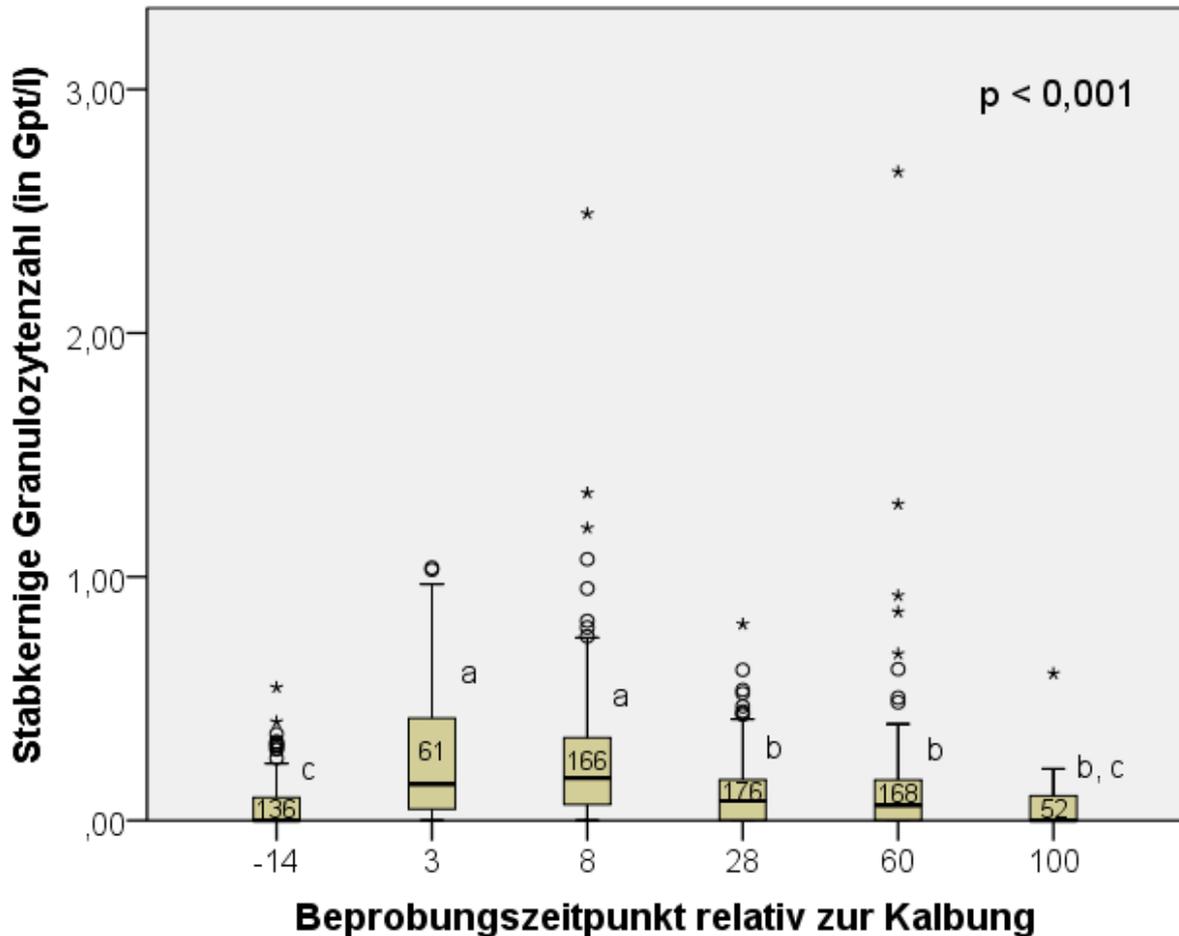


Abbildung 9: Stabkernige Granulozytenanzahl (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

4.2.6 Eosinophile Granulozyten

Der Anteil der eosinophilen Granulozyten (EosG) an den WBC im Laktationsverlauf ist in Abbildung 10 dargestellt, die absoluten Werte sind in Abbildung 11 zu sehen. Bei beiden zeigt sich ein höchst signifikanter Einfluss des Beprobungstages. Darüber hinaus sind signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Tagen untereinander zu erkennen. Es zeigt sich eine besondere Dynamik. Die Eosinophilen scheinen 14d a.p. ihre höchsten Werte zu erreichen, um dann nach der Kalbung abrupt abzufallen, welches sich speziell 3d und 8d p.p. in einem Tief widerspiegelt. Anschließend steigen sie dann allmählich wieder auf ein höheres Niveau an, welches sie 28d p.p. erreichen. Mit Ausnahme von 14d a.p. liegt für alle Beprobungstagen das erste Quartil der relativen Werte unter den üblichen Referenzintervall, bei den absoluten Werten sind das erste Quartil 3d, 8d und 100d p.p. niedriger als das Referenzintervall. Medianwerte und drittes Quartil befinden sich an allen Zeitpunkten innerhalb der üblichen Referenzlimits (Moritz et al., 2013a).

Ergebnisse

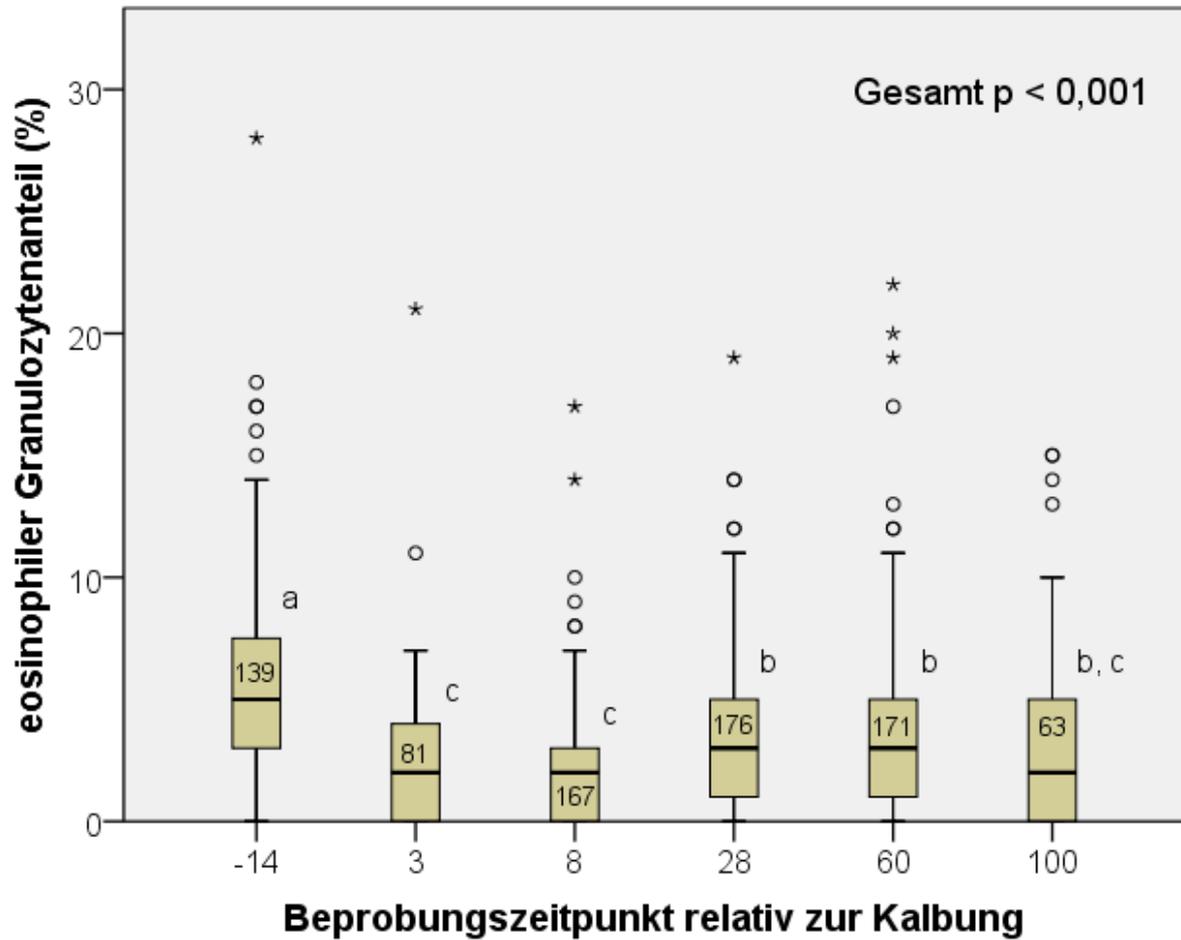


Abbildung 10: Eosinophiler Granulozytenanteil (in %) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Ergebnisse

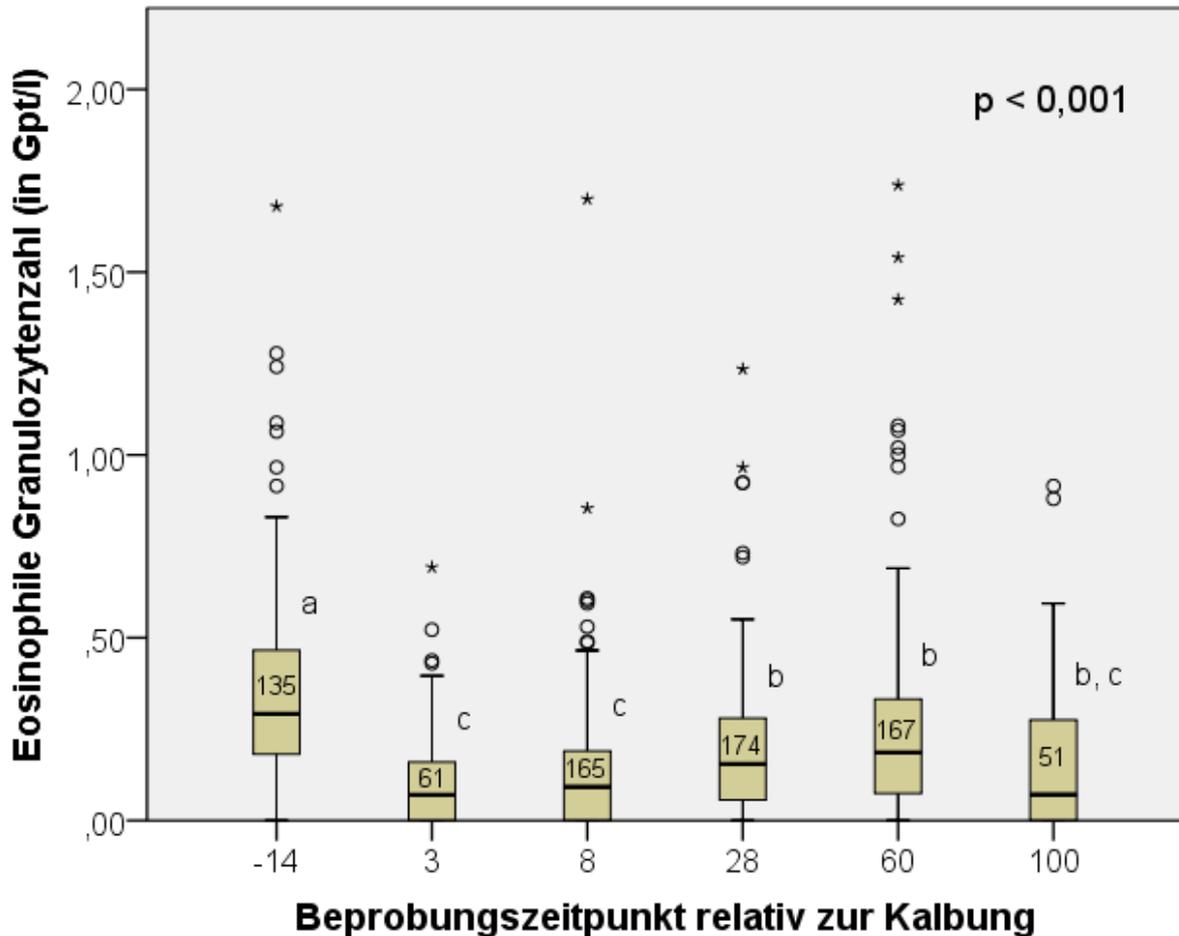


Abbildung 11: Eosinophile Granulozytenanzahl (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

4.2.7 Basophile Granulozyten

Im Anhang (Seite 141) in Abbildung 12 sind die relativen Werte, in Abbildung 13 die absoluten Werte der basophilen Granulozyten (BasG) dargestellt. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte aufgrund mangelnder Variabilität nicht getestet werden.

4.2.8 Juvenile Granulozyten

Die relativen und die absoluten Werte der juvenilen Granulozyten sind im Anhang in Abbildung 14 bzw. Abbildung 15 dargestellt. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte aufgrund mangelnder Variabilität nicht getestet werden.

Ergebnisse

4.3 Ableitung von Referenzwerten

In Tabelle 30 bis Tabelle 36 sind bestandsspezifische Referenzwerte für einzelne Laktationsabschnitte dargestellt. Außerdem wurden Beprobungstage, welche nicht signifikant unterschiedlich voneinander sind, zu Gruppen zusammengefasst. Für normalverteilte Werte (siehe Tabelle 21 im Teil Material und Methoden) wurden sowohl parametrische als auch nicht parametrische Grenzwerte bestimmt und gegenübergestellt. Für alle anderen Werte wurden nur nicht parametrische Grenzwerte bestimmt. Es erfolgte eine Auswertung von insgesamt 766 Blutproben aus den 2 Untersuchungszeiträumen von insgesamt 192 Rindern, beprobt zu verschiedenen Zeitpunkten.

4.3.1 WBC zu den jeweiligen Beprobungstagen

Tabelle 30: Referenzintervalle der WBC für die jeweiligen Untersuchungstagen

<i>Beprobungstage</i>	<i>Anzahl (N)</i>	<i>Perzentile</i>		<i>parametrisch</i>	
		<i>2,5%</i>	<i>97,5%</i>	<i>M-1,96*SD</i>	<i>M+1,96*SD</i>
14d a.p.	164	3,6	10,3	2,9	14,2
3d p.p.	82	2,3	15,2	2,9	16,9
8d p.p.	187	3,3	14,8	2,9	16,4
28d p.p.	184	3,4	9,6	2,8	13,2
60d p.p.	177	3,9	10,5	2,9	14,2
100d p.p.	77	4,5	10,1	2,9	14,8

alle Werte **normal verteilt**, M – Mittelwert SD – Standardabweichung

Ergebnisse

4.3.2 14 Tage a.p.

Tabelle 31: Absolute und relative Referenz-Intervalle 14d a.p.

	<i>Anzahl (N)</i>	<i>Relative Werte (in %)</i>		<i>Absolute Werte (in Gpt/l)</i>
	<i>Absolut/ relativ</i>	<i>parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>
Lymph	139 / 135	27 - 71	26 - 77	1,6 - 5,2
Mono	139 / 138	-	0 - 4	0 - 0,2
SeG	139 / 136	21 - 66	18 - 67	1 - 5,42
StaG	139 / 136	-	0 - 6	0 - 0,3
EosG	139 / 135	-	0 - 17	0 - 1,2
BasG	139 / 138	-	0 - 2	0 - 0,1
Juvenile Granulozyten	139 / 139	-	0 - 0	0 - 0

4.3.3 3 Tage p.p.

Tabelle 32: Absolute und relative Referenz-Intervalle 3d p.p.

	<i>Anzahl (N)</i>	<i>Relative Werte (in %)</i>		<i>Absolute Werte (in Gpt/l)</i>	
	<i>Absolut/ relativ</i>	<i>parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>	<i>parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>
Lymph	81 / 56	27 - 83	25 - 80	1,7 -5,7	1,7 - 6,3
Mono	81 / 70	-	0 - 4	-	0,0 - 0,4
SeG	81 / 61	-	9 - 69	-	0,3 - 11,9
StaG	81 / 61	-	0 - 26	-	0,0 - 1,0
EosG	81 / 61	-	0 - 11	-	0,0 - 0,6
BasG	81 / 80	-	0 - 2	-	0,0 - 0,1
Juvenile Granulozyten	81 / 80	-	0 - 1	-	0,0 - 0,0

Ergebnisse

4.3.4 8 Tage p.p.

Tabelle 33: Absolute und relative Referenz-Intervalle 8d p.p.

	<i>Anzahl (N)</i>	<i>Relative Werte (in %)</i>		<i>Absolute Werte (in Gpt/l)</i>	
		<i>Absolut/ relativ</i>	<i>parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>	<i>parametrisch</i>
Lymph	167 / 165	24 - 79	26 - 78	1,4- 4,8	1,5 - 4,9
Mono	167 / 166	-	0 - 4	-	0,0 - 0,2
SeG	167 / 166	-	12 - 69	-	0,8 - 5,2
StaG	167 / 166	-	0 - 14	-	0,0 - 0,5
EosG	167 / 165	-	0 - 9	-	0,0 - 0,9
BasG	167 / 166	-	0 - 2	-	0,0 - 0,1
Juvenile Granulozyten	167 / 166	-	0 - 3	-	0,0 - 0,0

4.3.5 28 Tage p.p.

Tabelle 34: Absolute und relative Referenz-Intervalle 28d p.p.

	<i>Anzahl (N)</i>	<i>Relative Werte (in %)</i>		<i>Absolute Werte (in Gpt/l)</i>	
		<i>Absolut/ relativ</i>	<i>parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>	<i>parametrisch</i>
Lymph	176 / 174	31 - 74	29 - 75	1,4 - 4,8	1,5 - 4,9
Mono	176 / 175	-	0 - 3	-	0 - 0,2
SeG	176 / 176	20 - 63	19 - 64	-	0,8 - 5,2
StaG	176 / 176	-	0 - 8	-	0 - 0,5
EosG	176 / 174	-	0 - 12	-	0 - 0,9
BasG	176 / 176	-	0 - 2	-	0 - 0,1
Juvenile Granulozyten	176 / 176	-	0 - 0	-	0 - 0,0

Ergebnisse

4.3.6 60 Tage p.p.

Tabelle 35: Absolute und relative Referenz-Intervalle 60d p.p.

	<i>Anzahl (N)</i>	<i>Relative Werte (in %)</i>		<i>Absolute Werte (in Gpt/l)</i>	
		<i>Absolut/ relativ</i>	<i>parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>	<i>parametrisch</i>
Lymph	171 / 167	30 - 72	26 - 72	-	1,5 - 5,1
Mono	171 / 169	-	0 - 3	-	0,0 - 0,2
SeG	171 / 168	21 - 65	23 - 69	-	1,2 - 5,4
StaG	171 / 168	-	0 - 11	-	0 - 0,8
EosG	171 / 167	-	0 - 16	-	0 - 1,1
BasG	171 / 170	-	0 - 2	-	0 - 0,1
Juvenile Granulozyten	171 / 171	-	0 - 0	-	0 - 0,0

4.3.7 100 Tage p.p.

Tabelle 36: Absolute und relative Referenz-Intervalle 100d p.p.

	<i>Anzahl (N)</i>	<i>Relative Werte (in %)</i>		<i>Absolute Werte (in Gpt/l)</i>	
		<i>Absolut/ relativ</i>	<i>parametrisch</i>	<i>nicht parametrisch</i>	<i>parametrisch</i>
Lymph	63 / 45	36 - 68	33 - 70	2,3 - 5,2	2,4 - 5,6
Mono	63 / 61	-	0 - 4	-	0,0 - 0,2
SeG	63 / 52	27 - 59	24 - 60	-	1,4 - 5,4
StaG	63 / 52	-	0 - 8	-	0,0 - 0,5
EosG	63 / 51	-	0 - 15	-	0,0 - 0,9
BasG	63 / 61	-	0 - 1	-	0,0 - 0,1
Juvenile Granulozyten	63 / 63	-	0 - 0	-	0,0 - 0,0

4.3.8 Referenzwerte für den gesamten Zeitraum

Für alle Beprobungstage wurde ein bestandsspezifisches Referenzintervall der Leukozyten inklusive Differentialblutbild erstellt. Dabei wurden signifikant unterschiedliche Tage nicht mit

Ergebnisse

einbezogen. Die Referenzintervalle sind Tabelle 37 zu entnehmen. Für nicht normal verteilte Parameter wurden Referenzwerte nur mittels des 95% Konfidenzintervalls erhoben.

Tabelle 37: Referenzintervalle des Weißen Blutbildes für alle Zeiträume zusammengefasst, signifikant verschiedene Beprobungstage wurden ausgeschlossen

<i>Referenzintervall</i>	<i>Perzentile:</i>		<i>Parametrisch:</i>		<i>Verteilung</i>
	<i>2,5%</i>	<i>97,5%</i>	<i>M-1,96*SD</i>	<i>M+1,96*SD</i>	
WBC¹ (Gpt/l)	3,7	11,2	2,8	10,6	normal
Lymph (%)	27	76	28,4	74,9	normal
Seg² (%)	18	68	18,7	65,5	normal
Eos³ (%)	0	13	-	-	n. normal
Mono⁴ (%)	0	3	-	-	n. normal
Stab³ (%)	0	8	-	-	n. normal
Baso (%)	0	2			mangelnde Variabilität
Lymph (Gpt/l)	1,5	5,1	1,4	5,0	normal
Seg (Gpt/l)	0,8	5,6	0,2	5,3	normal
Eos³ (Gpt/l)	0,0	1	-	-	n. normal
Mono² (Gpt/l)	0,0	0,2	-	-	n. normal
Stab³ (Gpt/l)	0,0	0,5	-	-	n. normal
Baso (Gpt/l)	0,0	0,9	-	-	mangelnde Variabilität

M – Mittelwert, SD – Standardabweichung, pp – post partum

¹ außer 28d p.p.; ² außer 3d p.p.; ³ nur 28, 60, 100d p.p.; ⁴ außer 3d p.p.

4.4 Zusammenhang zwischen Pansenfüllung / Trockensubstanzaufnahme und Differentialblutbild

Zwischen Pansenfüllung bzw. Trockensubstanzaufnahme (TS-Aufnahme) und Differentialblutbild der Kühe vor und nach dem Partus lassen sich Zusammenhänge vermuten. Um mögliche Zusammenhänge zu identifizieren, wurden im Folgenden für die verschiedenen Parameter Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten berechnet. Signifikante Korrelationen sind fett hervorgehoben.

4.4.1 Zusammenhang WBC und Pansenfüllung / TS-Aufnahme

In Tabelle 38 sind der Korrelationskoeffizient R mit dem jeweiligen p-Wert und der Anzahl der einbezogenen Tiere für die Beziehungen zwischen Trockensubstanzaufnahme bzw. Pansenfüllung und der Leukozytengesamtzahl dargestellt. Diese sind nach den jeweiligen Laktationsabschnitten unterteilt. Dabei zeigen Kühe 7 bzw. 8 Tage nach der Kalbung eine geringe Korrelation der WBC mit der TS-Aufnahme sehen.

Ergebnisse

Tabelle 38: Korrelation zwischen Pansenfüllung bzw. Trockensubstanzaufnahme und WBC an ausgewählten Beprobungstagen

	WBC	Trockensubstanzaufnahme				Pansenfüllung					
		7d p.p.	28d p.p.	63d p.p.	105d p.p.	7d a.p.	3d p.p.	11-14d p.p.	28d p.p.	60d p.p.	100d p.p.
16d –13d a.p.	<i>r</i>	,173*	,084	-,066	-,077	-,022	,016	,027	-,028	-,124	-,047
	<i>p</i>	,044	,315	,430	,423	,777	,900	,734	,733	,352	,644
	<i>N</i>	137	146	147	110	162	62	156	151	58	100
3d p.p.	<i>r</i>	,007	,056	,032	,264	,232*	,164	,102	-,046	-,120	-,011
	<i>p</i>	,962	,631	,785	,120	,036	,142	,370	,690	,305	,927
	<i>N</i>	50	75	76	36	82	81	79	76	75	73
8d p.p.	<i>r</i>	,283**	,145	-,035	,110	,046	,350**	,154*	-,005	-,155	-,100
	<i>p</i>	,000	,059	,645	,231	,532	,001	,038	,943	,181	,281
	<i>N</i>	154	171	171	121	187	82	182	176	76	119
28d p.p.	<i>r</i>	,215**	,029	-,091	,148	,026	,150	,188*	,054	-,037	-,226*
	<i>p</i>	,008	,709	,233	,107	,730	,185	,011	,476	,751	,014
	<i>N</i>	153	173	173	120	184	80	184	178	76	119
60d p.p.	<i>r</i>	,086	-,033	-,124	,160	-,003	,195	,084	,021	,197	-,161
	<i>p</i>	,293	,667	,104	,088	,971	,090	,263	,781	,088	,081
	<i>N</i>	150	171	172	115	177	77	177	177	76	119
100d p.p.	<i>r</i>	-,017	-,039	-,083	,092	,228*	,181	,465**	,382**	,046	-,219
	<i>p</i>	,904	,740	,472	,599	,046	,116	,000	,001	,696	,061
	<i>N</i>	51	76	77	35	77	77	77	77	76	74

Ergebnisse

4.4.2 Zusammenhang relative Werte Leukozyten und Pansenfüllung

Wie in (Tabelle 39) dargestellt, lässt sich eine geringe Korrelation zwischen den segmentkernigen neutrophilen Granulozyten und der Pansenfüllung der Kühe am 3. Tag p.p. erkennen. Die Lymphozyten hingegen zeigen eine geringe negative Korrelation zur Pansenfüllung 3 Tage p.p. Für beide gilt, dass sie einen höchst signifikanten p-Wert aufweisen.

4.5 Zusammenhang zwischen weiteren Untersuchungsparametern und Differentialblutbild

Zwischen einigen Leukozyten – Fraktionen und den Untersuchungsparametern BHB und NEFA wurden für ausgewählte Beprobungstage Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten berechnet, um mögliche Zusammenhänge identifizieren zu können.

4.5.1 BHB

Mögliche Beziehungen zwischen den gemessenen WBC – Werten im peripheren Blut und der Ketonkörper – Konzentration (BHB) wurden untersucht. Die gefunden Korrelationen (fett gedruckt in Tabelle 40) bringen jedoch keine verwertbare Vorhersagekraft für einen der Parameter. In Tabelle 41 sind die Spearman-Rang-Korrelationskoeffizienten für die BHB-Konzentration und den segmentkernigen neutrophilen Granulozyten berechnet worden. Es gibt ca. 2 Wochen a.p. eine sehr geringe negative Korrelation mit signifikanten p – Wert zwischen BHB und SeG. Auch für alle weiteren Leukozyten – Fraktionen wurden Korrelationskoeffizienten berechnet, jedoch keine bemerkenswerten Zusammenhänge mit der BHB - Konzentration gefunden, weshalb auf die Darstellung dieser Daten hier verzichtet wurde.

Ergebnisse

Tabelle 39: Korrelation zwischen Pansenfüllung und Differentialblutbild vor und nach der Geburt

<i>relative Leukozyten</i>		<i>Pansenfüllung</i>	
		Tag 7 a.p.	Tag 3 p.p.
<i>Lymph14d a.p.</i>	<i>r</i>	0,149	0,137
	<i>p</i>	0,158	0,108
	<i>N</i>	92	138
<i>Mono 14d a.p.</i>	<i>r</i>	0,141	0,044
	<i>p</i>	0,180	0,611
	<i>N</i>	92	138
<i>SeG 14d a.p.</i>	<i>r</i>	-0,152	-0,127
	<i>p</i>	0,147	0,138
	<i>N</i>	92	138
<i>StaG 14d a.p.</i>	<i>r</i>	-0,132	0,115
	<i>p</i>	0,210	0,179
	<i>N</i>	92	138
<i>EosG 14d a.p.</i>	<i>r</i>	0,076	-0,059
	<i>p</i>	0,473	0,489
	<i>N</i>	92	138
<i>BasG 14d a.p.</i>	<i>r</i>	-0,149	0,032
	<i>p</i>	0,158	0,708
	<i>N</i>	92	138
<i>Lymph 3d p.p.</i>	<i>r</i>	-0,018	-0,465**
	<i>p</i>	0,904	0,000
	<i>N</i>	45	81
<i>Mono 3d p.p.</i>	<i>r</i>	0,099	-0,042
	<i>p</i>	0,518	0,708
	<i>N</i>	45	81
<i>SeG 3d p.p.</i>	<i>r</i>	0,076	0,443**
	<i>p</i>	0,621	0,000
	<i>N</i>	45	81
<i>StaG 3d p.p.</i>	<i>r</i>	-0,207	-0,080
	<i>p</i>	0,173	0,478
	<i>N</i>	45	81
<i>EosG 3d p.p.</i>	<i>r</i>	-0,218	-0,189
	<i>p</i>	0,150	0,092
	<i>N</i>	45	81
<i>BasG 3d p.p.</i>	<i>r</i>	-0,042	0,090
	<i>p</i>	0,785	0,423
	<i>N</i>	45	81

Ergebnisse

Tabelle 40: Korrelation zwischen den WBC – Werten und der BHB – Konzentration an ausgewählten Beprobungstagen

BHB Konzentration		WBC 14d a.p. (Gpt/l)	WBC 3d p.p. (Gpt/l)	WBC 8d p.p. (Gpt/l)	WBC 28d p.p. (Gpt/l)
16 – 13d a.p.	r	-,085	,071	,074	-,039
	p	,282	,587	,571	,627
	N	163	61	61	161
2d p.p.	r	-,116	-,118	-,047	-,211**
	p	,143	,292	,676	,004
	N	162	81	81	183
3d p.p.	r	-,083	-,116	-,116	-,177
	p	,523	,302	,300	,117
	N	62	81	82	80
11-14d p.p.	r	-,222**	,002	,016	-,067
	p	,005	,985	,888	,369
	N	156	79	80	184

Tabelle 41: Korrelation zwischen den absoluten Werten der SeG und der BHB – Konzentration an ausgewählten Beprobungstagen

BHB (in mmol/l)		SeG 14d a.p. (Gpt/l)	SeG 3d p.p. (Gpt/l)	SeG 8d p.p. (Gpt/l)	SeG 28d p.p. (Gpt/l)
16 – 13d a.p.	r	-,189*	,169	-,042	-,030
	p	,029	,324	,619	,713
	N	134	36	145	154
2d p.p.	r	-,035	-,260	-,105	-,097
	p	,689	,053	,181	,204
	N	134	56	165	174
3d p.p.	r	-,049	-,172	-,092	-,216**
	p	,579	,208	,241	,004
	N	133	55	165	173
11-14d p.p.	r	-,097	-,195	,086	,064
	p	,494	,150	,475	,588
	N	52	56	72	74
28d p.p.	r	-,216*	-,051	,028	,047
	p	,014	,712	,725	,540
	N	129	54	160	174

Ergebnisse

4.5.2 NEFA

Mögliche Beziehungen zwischen den gemessenen WBC – Werten im peripheren Blut und der NEFA – Konzentration wurden untersucht. Die gefunden Korrelationen (fett gedruckt in Tabelle 42) lassen sich jedoch nicht eindeutig interpretieren. Auch für alle weiteren Leukozyten-Fractionen wurden Korrelationskoeffizienten berechnet, jedoch keine bemerkenswerten Zusammenhänge mit der NEFA - Konzentration gefunden, weshalb auf die Darstellung dieser Daten hier verzichtet wurde.

Tabelle 42: Korrelation zwischen den WBC – Werten und der NEFA – Konzentration an ausgewählten Beprobungstagen

<i>NEFA (in mmol/l)</i>		<i>WBC 14d a.p. (Gpt/l)</i>	<i>WBC 3d p.p. (Gpt/l)</i>	<i>WBC 8d p.p. (Gpt/l)</i>	<i>WBC 28d p.p. (Gpt/l)</i>
16 – 13d a.p.	<i>r</i>	-,079	-,170	,036	-,070
	<i>p</i>	,319	,191	,784	,379
	N	163	61	61	161
2d p.p.	<i>r</i>	-,011	-,159	-,261*	-,150*
	<i>p</i>	,887	,157	,019	,043
	N	162	81	81	183
3d p.p.	<i>r</i>	,082	-,142	-,134	-,309**
	<i>p</i>	,529	,207	,230	,005
	N	62	81	82	80
11-14d p.p.	<i>r</i>	,013	-,111	-,041	-,171*
	<i>p</i>	,870	,328	,718	,020
	N	156	79	80	184

4.6 Zusammenhang zwischen ausgewählten Erkrankungen und Differentialblutbild

Im Rahmen der Untersuchungen wurden Milchrinder, welche im Studienverlauf Krankheiten entwickelten, in Hinblick auf Veränderungen im Blutbild beleuchtet. Dahingehend wurden einige wichtige und häufig vorkommende Krankheiten ausgewählt und diese zum Teil zu Gruppen zusammengefasst. Betrachtet werden Klauenerkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, Fruchtbarkeitsstörungen, Metritiden, Nachgeburtsverhaltung und Totgeburten.

Zur Identifizierung und Analysierung von Zusammenhängen zwischen den genannten Krankheiten und dem Differentialblutbild wurden logistische Regressionen verwendet. Der Regressionskoeffizient „B“ und die Odds Ratio „Exp (B)“ sind in den nachfolgenden Tabellen angegeben. Signifikante Zusammenhänge basieren auf dem Niveau $p < 0,05$ und sind fett gedruckt, Tendenzen wurden mit dem Symbol „*“ markiert. Es wurden lediglich Laktationsabschnitte, welche statistische Zusammenhänge aufweisen, dargestellt.

Ergebnisse

4.6.1 Klauenerkrankung

In dieser Gruppe wurden folgende Diagnosen zusammengefasst: Rusterholz'sches Sohlengeschwür, Sohlengeschwüre anderer Lokalisation, Druckstellen, dünne Sohle, lose Wand, eitrige hohle Wand, Klauenrehe, Dermatitis Digitalis, Mortellaro, Ballenhornfäule, Limax, Panaritium und sonstige Klauenerkrankungen (wie z.B. Wunden). Alle Milchkühe, welche im Untersuchungszeitraum Klauenbefunde aufwiesen (119 Rinder), wurden einbezogen.

In nachfolgenden Tabellen (Tabelle 43 - Tabelle 46) werden Einflüsse von Klauenerkrankungen auf Leukozyten für einzelne Laktationsabschnitte dargestellt. Diese zeigen keine signifikanten Zusammenhänge, sondern weisen lediglich Tendenzen auf. Diese scheinen keine belastbaren Zusammenhänge zwischen Klauenerkrankungen und Leukozyten auf Herdenebene zu bringen.

Tabelle 43: Zusammenhang zwischen WBC und Klauenerkrankungen für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>WBC (in Gpt/l)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>14d a.p.</i>	0,010	0,094	0,916	1,010
<i>Konstante</i>	0,602	0,619	0,331	1,825
<i>3d p.p.</i>	-0,064	0,099	0,518	0,938
<i>Konstante</i>	1,992	0,794	0,012	7,332
<i>8d p.p.</i>	0,009	0,073	0,903	1,009
<i>Konstante</i>	0,567	0,512	0,268	1,763
<i>28d p.p.</i>	0,022	0,111	0,840	1,023
<i>Konstante</i>	0,594	0,681	0,383	1,811
<i>60d p.p.</i>	0,220	0,115	0,056*	1,246
<i>Konstante</i>	-0,664	0,734	0,366	0,515
<i>100d p.p.</i>	0,022	0,258	0,931	1,023
<i>Konstante</i>	1,726	1,813	0,341	5,617

Ergebnisse

Tabelle 44: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Klauenerkrankung für den Beprobungszeitpunkt 14d a.p.

<i>Relativer Leukozytenanteil 14d a.p. (in %)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	0,007	0,016	0,657	1,007
<i>Konstante</i>	0,138	0,820	0,866	1,149
<i>Monozyten</i>	-0,047	0,186	0,800	0,954
<i>Konstante</i>	0,521	0,208	0,012	1,684
<i>SeG</i>	0,009	0,016	0,578	1,009
<i>Konstante</i>	0,113	0,707	0,873	1,119
<i>StabG</i>	-0,190	0,114	0,096*	0,827
<i>Konstante</i>	0,708	0,223	0,002	2,030
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	-0,093	0,048	0,050*	0,911
<i>Konstante</i>	1,037	0,333	0,002	2,821
<i>Basophile Granulozyten</i>	-0,055	0,374	0,882	0,946
<i>Konstante</i>	0,507	0,197	0,010	1,659

Tabelle 45: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Klauenerkrankung für den Beprobungszeitpunkt 3d p.p.

<i>Relativer Leukozytenanteil 3d p.p. (in %)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	0,021	0,018	0,231	1,022
<i>Konstante</i>	-0,200	0,988	0,840	0,819
<i>Monozyten</i>	0,121	0,196	0,537	1,129
<i>Konstante</i>	0,840	0,318	0,008	2,317
<i>SeG</i>	-0,007	0,016	0,656	0,993
<i>Konstante</i>	1,215	0,627	0,053	3,369
<i>StaG</i>	-0,061	0,038	0,109	0,941
<i>Konstante</i>	1,310	0,348	0,000	3,708
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	0,060	0,100	0,548	1,062
<i>Konstante</i>	0,824	0,338	0,015	2,279
<i>Basophile Granulozyten</i>	-1,346	0,756	0,075*	0,260
<i>Konstante</i>	1,105	0,273	0,000	3,020
<i>Juvenile Granulozyten</i>	-0,504	0,571	0,378	0,604
<i>Konstante</i>	1,016	0,262	0,000	2,762

Ergebnisse

Tabelle 46: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Klauenerkrankung für den Beprobungszeitpunkt 60d p.p.

Absolute Leukozytenanzahl 60d p.p. (in Gpt/l)	B	Standardfehler	Sig.	Exp(B)
Lymphozyten	0,093	0,172	0,590	1,097
Konstante	0,368	0,574	0,522	1,444
Monozyten	3,855	3,663	0,293	47,222
Konstante	0,591	0,186	0,002	1,805
SeG	0,328	0,188	0,080*	1,388
Konstante	-0,211	0,519	0,685	0,810
StaG	1,340	1,053	0,203	3,819
Konstante	0,510	0,204	0,012	1,665
Eosinophile Granulozyten	0,033	0,628	0,958	1,034
Konstante	0,657	0,229	0,004	1,928
Basophile Granulozyten	-0,153	4,912	0,975	0,858
Konstante	0,695	0,183	0,000	2,005

4.6.2 Stoffwechselerkrankung

Unter dieser Kategorie finden sich Studientiere wieder, welche in einen der beiden Untersuchungszeiträumen mindestens eine der folgenden Diagnosen erhielten: Gebärpause, Ketose oder DLA. Tabelle 47 gibt eine Übersicht über die Zusammenhänge von WBC und Stoffwechselerkrankungen. Es wurden keine signifikanten Assoziationen gefunden. In Tabelle 48 bis Tabelle 50 sind für den unmittelbaren postpartalen Zeitraum die Zusammenhänge zwischen Differentialblutbild und entsprechenden Erkrankungen dargestellt. Lediglich 28d p.p. konnte eine signifikante Assoziation gefunden werden: Milchrinder mit hohen eosinophilen Granulozyten scheinen ein niedrigeres Risiko zu besitzen, an Stoffwechselerkrankungen zu leiden.

Ergebnisse

Tabelle 47: Zusammenhang zwischen WBC und Stoffwechselerkrankungen für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>WBC (in Gpt/l)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>14d a.p.</i>	0,014	0,101	0,892	1,014
<i>Konstante</i>	-1,152	0,667	0,084	0,316
<i>3d p.p.</i>	0,136	0,104	0,189	1,146
<i>Konstante</i>	-2,860	0,887	0,001	0,057
<i>8d p.p.</i>	-0,120	0,090	0,180	0,887
<i>Konstante</i>	-0,421	0,600	0,484	0,657
<i>28d p.p.</i>	-0,215	0,133	0,105	0,807
<i>Konstante</i>	0,013	0,785	0,987	1,013
<i>60d p.p.</i>	-0,073	0,124	0,559	0,930
<i>Konstante</i>	-0,840	0,803	0,296	0,432
<i>100d p.p.</i>	-0,469	0,322	0,145	0,625
<i>Konstante</i>	1,086	2,071	0,600	2,963

Tabelle 48: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Stoffwechselerkrankungen für den Beprobungszeitpunkt 3d p.p.

<i>Relativer Leukozytenanteil 3d p.p. (in %)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	-0,046	0,024	0,061*	0,955
<i>Konstante</i>	0,486	1,234	0,694	1,625
<i>Monozyten</i>	-0,106	0,263	0,688	0,900
<i>Konstante</i>	-1,782	0,418	0,000	0,168
<i>SeG</i>	0,023	0,021	0,272	1,023
<i>Konstante</i>	-2,765	0,913	0,002	0,063
<i>StaG</i>	0,084	0,044	0,057*	1,087
<i>Konstante</i>	-2,441	0,493	0,000	0,087
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	-0,092	0,151	0,545	0,912
<i>Konstante</i>	-1,688	0,451	0,000	0,185
<i>Basophile Granulozyten</i>	-18,340	13698,129	0,999	0,000
<i>Konstante</i>	-1,808	0,341	0,000	0,164
<i>Juvenile Granulozyten</i>	-16,283	8685,999	0,999	0,000
<i>Konstante</i>	-1,856	0,340	0,000	0,156

Ergebnisse

Tabelle 49: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Stoffwechselerkrankungen für den Beprobungszeitpunkt 28d p.p.

<i>Relativer Leukozytenanteil 28d p.p. (in %)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	0,025	0,018	0,163	1,025
<i>Konstante</i>	-2,609	0,983	0,008	0,074
<i>Monozyten</i>	-0,250	0,240	0,298	0,779
<i>Konstante</i>	-1,159	0,217	0,000	0,314
<i>Segmentkernige Granulozyten</i>	-0,017	0,018	0,341	0,983
<i>Konstante</i>	-0,601	0,732	0,412	0,548
<i>Stabkernige Granulozyten</i>	0,108	0,081	0,183	1,114
<i>Konstante</i>	-1,514	0,263	0,000	0,220
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	-0,212	0,086	0,014	0,809
<i>Konstante</i>	-0,700	0,278	0,012	0,497
<i>Basophile Granulozyten</i>	0,383	0,315	0,223	1,467
<i>Konstante</i>	-1,386	0,210	0,000	0,250

4.6.3 Fruchtbarkeitsstörung

Unter Fruchtbarkeitsstörungen sind Kühe zusammengefasst, welche Nachgeburtsverhaltung (NGV), Ovarialzysten, Metritiden oder Endometritiden als Befunde aufwiesen. Es wurde auf Zusammenhänge mit dem Differentialblutbild für einzelne Laktationsabschnitte untersucht. Die Ergebnisse finden sich in Tabelle 50 bis Tabelle 54. Die Berechnungen führen zu einigen signifikanten Ergebnissen bei den relativen Leukozytenwerten: Hohe Werte an WBC und segmentkernige Neutrophilen 8d p.p. sind scheinbar mit einem niedrigeren Risiko von Milchkühen, Fruchtbarkeitsstörungen zu entwickeln, verbunden. Im Gegensatz dazu scheinen hohe Werte an Lymphozyten und stabkernige Neutrophilen die Wahrscheinlichkeit für Fruchtbarkeitsstörungen zu steigern. Ähnliche Beobachtungen ergeben 3d und 8d p.p. die absoluten Werte. Die einzige Ausnahme sind die signifikanten Ergebnisse der Lymphozyten 8d p.p. Im Gegensatz zu den relativen Werten besteht ein erniedrigtes Risiko bei Kühen mit großen Lymphozyten-Vorkommen an Fruchtbarkeitsstörungen zu erkranken. Bei akuten Erkrankungen wie Metritiden oder Endometritiden kann es zum Verbrauch der segmentkernigen Neutrophilen mit Linksverschiebung kommen, was sich in diesen Ergebnissen widerspiegeln könnte.

Ergebnisse

Tabelle 50: Zusammenhang zwischen WBC und Fruchtbarkeitsstörungen für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>WBC (in Gpt/l)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>14d a.p.</i>	-0,103	0,099	0,297	0,902
<i>Konstante</i>	0,037	0,636	0,953	1,038
<i>3d p.p.</i>	-0,172	0,130	0,186	0,842
<i>Konstante</i>	-0,292	0,875	0,739	0,747
<i>8d p.p.</i>	-0,396	0,097	0,000	0,673
<i>Konstante</i>	1,908	0,622	0,002	6,740
<i>28d p.p.</i>	-0,155	0,112	0,167	0,856
<i>Konstante</i>	0,300	0,682	0,660	1,350
<i>60d p.p.</i>	-0,081	0,107	0,450	0,922
<i>Konstante</i>	-0,152	0,697	0,828	0,859
<i>100d p.p.</i>	0,084	0,218	0,699	1,088
<i>Konstante</i>	-2,031	1,561	0,193	0,131

Tabelle 51: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Fruchtbarkeitsstörungen für den Beprobungszeitpunkt 3d p.p.

<i>Relativer Leukozytenanteil 3d p.p. (in %)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	0,014	0,019	0,466	1,014
<i>Konstante</i>	-1,954	1,124	0,082	0,142
<i>Monozyten</i>	-0,128	0,209	0,541	0,880
<i>Konstante</i>	-1,042	0,334	0,002	0,353
<i>SeG</i>	-0,030	0,018	0,094*	0,971
<i>Konstante</i>	-0,171	0,625	0,784	0,842
<i>StaG</i>	0,115	0,042	0,006	1,122
<i>Konstante</i>	-1,886	0,402	0,000	0,152
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	-0,034	0,099	0,733	0,967
<i>Konstante</i>	-1,091	0,351	0,002	0,336
<i>Basophile Granulozyten</i>	0,171	0,687	0,803	1,187
<i>Konstante</i>	-1,187	0,279	0,000	0,305
<i>Juvenile Granulozyten</i>	-17,017	8742,071	0,998	0,000
<i>Konstante</i>	-1,135	0,271	0,000	0,321

Ergebnisse

Tabelle 52: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild (absolute Werte) und Fruchtbarkeitsstörungen für den Beprobungszeitpunkt 3d p.p.

<i>Absolute Leukozytenanzahl 3d p.p. (in Gpt/l)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	-0,519	0,413	0,208	0,595
<i>Konstante</i>	0,277	1,430	0,847	1,319
<i>Monozyten</i>	-2,701	3,340	0,419	0,067
<i>Konstante</i>	-0,971	0,331	0,003	0,379
<i>SeG</i>	-0,656	0,371	0,077	0,519
<i>Konstante</i>	-0,313	0,670	0,640	0,731
<i>StaG</i>	2,806	1,133	0,013	16,539
<i>Konstante</i>	-2,503	0,599	0,000	0,082
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	-3,956	3,024	0,191	0,019
<i>Konstante</i>	-0,925	0,401	0,021	0,396
<i>Basophile Granulozyten</i>	-368,002	243013,570	0,999	0,000
<i>Konstante</i>	-1,156	0,278	0,000	0,315
<i>juvenile Granulozyten</i>	-436,259	873760,219	1,000	0,000
<i>Konstante</i>	-1,135	0,271	0,000	0,321

Tabelle 53: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Fruchtbarkeitsstörungen für den Beprobungszeitpunkt 8d p.p.

<i>Relativer Leukozytenanteil 8d p.p. (in %)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	0,034	0,013	0,009	1,034
<i>Konstante</i>	-2,499	0,716	0,000	0,082
<i>Monozyten</i>	0,002	0,159	0,989	1,002
<i>Konstante</i>	-0,714	0,197	0,000	0,490
<i>SeG</i>	-0,044	0,012	0,000	0,957
<i>Konstante</i>	1,020	0,508	0,045	2,773
<i>StaG</i>	0,145	0,048	0,002	1,156
<i>Konstante</i>	-1,316	0,268	0,000	0,268
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	-0,023	0,074	0,756	0,977
<i>Konstante</i>	-0,666	0,224	0,003	0,514
<i>Basophile Granulozyten</i>	0,209	0,337	0,535	1,232
<i>Konstante</i>	-0,751	0,181	0,000	0,472
<i>Juvenile Granulozyten</i>	0,500	0,376	0,184	1,648
<i>Konstante</i>	-0,773	0,174	0,000	0,462

Ergebnisse

Tabelle 54: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild (absolute Werte) und Fruchtbarkeitsstörungen für den Beprobungszeitpunkt 8d p.p.

<i>Absolute Leukozytenanzahl 8d p.p. (in Gpt/l)</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
<i>Lymphozyten</i>	-0,349	0,175	0,047	0,705
<i>Konstante</i>	0,431	0,584	0,460	1,539
<i>Monozyten</i>	-2,654	2,601	0,308	0,070
<i>Konstante</i>	-0,594	0,197	0,003	0,552
<i>SeG</i>	-0,641	0,150	0,000	0,527
<i>Konstante</i>	0,960	0,398	0,016	2,610
<i>StaG</i>	0,964	0,577	0,095*	2,622
<i>Konstante</i>	-0,965	0,233	0,000	0,381
<i>Eosinophile Granulozyten</i>	-1,723	1,250	0,168	0,178
<i>Konstante</i>	-0,484	0,225	0,031	0,616
<i>Basophile Granulozyten</i>	0,340	5,045	0,946	1,404
<i>Konstante</i>	-0,707	0,180	0,000	0,493
<i>juvenile Granulozyten</i>	7,167	5,736	0,212	1295,722
<i>Konstante</i>	-0,760	0,174	0,000	0,467

4.6.4 Retentio secundinarum

Es wurde untersucht, ob es einen Einfluss vom Differentialblutbild a.p. auf NGV p.p. gibt (Tabelle 55). Für WBC sowie relative und absolute Werte der Lymphozyten und segmentkernige neutrophile Granulozyten wurden Berechnungen angestellt. Jedoch lieferte dies keine signifikanten Ergebnisse. Die anderen Leukozyten wurden aufgrund mangelnder Werte nicht berücksichtigt. Insgesamt konnten 15 Studienrinder einbezogen werden, welche p.p. NGV in den Untersuchungszeiträumen entwickelten.

Außerdem wurde untersucht, ob die Krankheit NGV Einflüsse auf die Leukozyten besitzt. Dazu wurden t-Tests für normalverteilte und Mann-Whitney-U-Tests für nicht als normal verteilt angenommene Parameter verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 56 und Tabelle 57 sowie im Anhang dargestellt. Nur Parameter mit relevanten Zusammenhängen zur NGV wurden aufgeführt. Dabei wurden für 8d p.p. hoch signifikante (WBC) bzw. höchst signifikante (segmentkernige Neutrophile und Lymphozyten) Ergebnisse erzielt. Milchkühe mit NGV hatten höhere relative Mittelwerte der Lymphozyten und niedrigere relative Mittelwerte der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten. Zudem wurde ein Einfluss von NGV bei Kühen auf deren WBC und absoluten segmentkernigen Neutrophilen Werten 8d p.p. gefunden.

Ergebnisse

Tabelle 55: Differentialblutbild für ausgewählte Parameter a.p. unter Betrachtung von NGV p.p.

<i>Blutbild 14d a.p.</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
Gesamtleukozytenzahl	0,009	0,149	0,952	1,009
Konstante	-1,956	0,957	0,041	0,141
Relative Lymphozytenanteil	0,010	0,029	0,741	1,010
Konstante	-2,501	1,484	0,092	0,082
Relative SeG	-0,001	0,030	0,965	0,999
Konstante	-1,971	1,337	0,140	0,139
Lymphozytenanzahl	0,165	0,307	0,590	1,180
Konstante	-2,452	0,969	0,011	0,086
SeG absolute Anzahl	-0,034	0,311	0,913	0,967
Konstante	-1,885	0,877	0,032	0,152

Tabelle 56: Zusammenhang zwischen NGV und Lymphozyten für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>Lymphozyten (in %)</i>	<i>t-Test</i>	
	<i>p</i>	<i>Mittelwertdifferenz gesunde Kühe - NGV Kühe</i>
14d a.p.	,744	-1,263
3d p.p.	,070*	6,818
8d p.p.	,000	-13,914
28d p.p.	,726	1,028
60d p.p.	,224	4,063
100d p.p.	,966	-,250

Tabelle 57: Zusammenhang zwischen NGV und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (relative Werte) für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>Segmentkernige Granulozyten (in %)</i>	<i>t-Test</i>	
	<i>p</i>	<i>Mittelwertdifferenz gesunde Kühe - NGV Kühe</i>
14d a.p.	,965	,168
3d p.p.	,932	-1,182
8d p.p.	,000	16,380
28d p.p.	,598	-1,570
60d p.p.	,275	-3,941
100d p.p.	,486	3,938

Ergebnisse

4.6.5 Totgeburten

Während der Untersuchungszeiträume erlitten 8 Kühe Totgeburten, Zusammenhänge mit dem Differentialblutbild wurden dahingehend untersucht. In Tabelle 58 ist erkennbar, dass keine Einflüsse der Leukozyten 14d a.p. auf Kühe mit Totgeburten ermittelt werden konnten. Die Identifizierung erfolgte mittels logistischer Regression. Sowohl relative (in %) als auch absolute (in Gpt/l) Leukozytenwerte wurden mit einbezogen. Der Inhalt der Tabelle 59 und Tabelle 60 gibt Aufschluss über Einflüsse von Totgeburten auf das Differentialblutbild. Zusätzlich finden sich dazu im Anhang die absoluten Werte. Als statistische Tests fanden der t-Test (normalverteilte Parameter) und der Man-Whitney-U-Test Einsatz. Signifikante Zusammenhänge konnten nicht gefunden werden, die Tendenzen wurden mit „*“ gekennzeichnet.

Ergebnisse

**Tabelle 58: Zusammenhang zwischen Differentialblutbild und Totgeburten für den Be-
probungszeitpunkt 14d a.p, B – Regressionskoeffizient, Exp(B) – Odds Ratio**

<i>Blutbild 14d a.p.</i>	<i>B</i>	<i>Standardfehler</i>	<i>Sig.</i>	<i>Exp(B)</i>
Gesamtleukozytenzahl	-0,415	0,306	0,175	0,661
Konstante	-0,835	1,714	0,626	0,434
Relative Lymphozytenanteil	0,060	0,037	0,101	1,062
Konstante	-6,269	2,108	0,003	0,002
Relative Monozytenanteil	-0,869	0,909	0,339	0,420
Konstante	-2,808	0,448	0,000	0,060
Relative segmentkerniger Granulozytenanteil	-0,054	0,039	0,168	0,948
Konstante	-0,942	1,500	0,530	0,390
Relative stabkerniger Granulozytenanteil	0,168	0,224	0,453	1,183
Konstante	-3,292	0,532	0,000	0,037
Relative eosinophiler Granulozytenanteil	-0,105	0,129	0,416	0,900
Konstante	-2,542	0,722	0,000	0,079
Relative basophiler Granulozytenanteil	0,457	0,721	0,526	1,579
Konstante	-3,205	0,479	0,000	0,041
Lymphozytenanzahl	0,035	0,427	0,935	1,036
Konstante	-3,160	1,386	0,023	0,042
Monozytenanzahl	-16,322	16,217	0,314	0,000
Konstante	-2,780	0,443	0,000	0,062
Segmentkernige Granulozytenenzahl	-0,934	0,541	0,084*	0,393
Konstante	-0,900	1,155	0,436	0,407
Stabkernige Granulozytenenzahl	2,183	3,480	0,530	8,874
Konstante	-3,224	0,516	0,000	0,040
Eosinophile Granulozytenenzahl	-2,656	2,297	0,247	0,070
Konstante	-2,278	0,692	0,001	0,102
Basophile Granulozytenenzahl	6,793	11,955	0,570	891,871
Konstante	-3,179	0,472	0,000	0,042

Ergebnisse

Tabelle 59: Zusammenhang zwischen Totgeburten und Lymphozyten (relative Werte) für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>Lymphozyten (in %)</i>	<i>t-Test</i>	
	<i>p</i>	<i>Mittelwertdifferenz zwischen gesunden und Kühen mit Totgeburten</i>
<i>14d a.p.</i>	0,355	-7,695
<i>3d p.p.</i>	0,125	-12,936
<i>8d p.p.</i>	0,118	-8,310
<i>28d p.p.</i>	0,077*	-8,243
<i>60d p.p.</i>	0,248	-5,185
<i>100d p.p.</i>	0,061*	-9,083

Tabelle 60: Zusammenhang zwischen Totgeburten und segmentkernige neutrophile Granulozyten (relative Werte) für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>Segmentkernige Granulozyten (in %)</i>	<i>t-Test</i>	
	<i>p</i>	<i>Mittelwertdifferenz zwischen gesunden und Kühen mit Totgeburten</i>
<i>14d a.p.</i>	0,164	6,492
<i>3d p.p.</i>	0,250	11,000
<i>8d p.p.</i>	0,235	6,878
<i>28d p.p.</i>	0,275	5,069
<i>60d p.p.</i>	0,472	3,401
<i>100d p.p.</i>	0,149	7,117

5 Diskussion

5.1 Untersuchung des methodischen Fehlers

Zur Untersuchung des methodischen Fehlers bei der manuellen Differenzierung von Blutausstrichen wurden in dieser Studie Mittelwerte, Standardabweichungen und Variationskoeffizienten bestimmt. Diese Parameter sollten hauptsächlich zur Einschätzung der Präzision bzw. Reproduzierbarkeit dieser Methode dienen. Es wurden aufgrund der Praktikabilität und Routinetauglichkeit 100 Leukozyten manuell differenziert. Eine Erhöhung der ausgezählten Zellen auf 200, 500 oder gar 1000 hätte eine Verbesserung der Genauigkeit der Methode gebracht, wäre jedoch auch mit deutlich erhöhtem personellen und zeitlichen Aufwand verbunden gewesen, besonders in Anbetracht der hohen Anzahl an differenzierten Blutausstrichen (Rümke, 1985; Weiser et al., 2007). Ein Vergleich mit einem anderen Analyseverfahren fand nicht statt. Nach Houwen (2001) sind Untersucher nicht immer gleicher Meinung beim Differenzieren der Zellen. Insbesondere bei Monozyten und stabkernigen Neutrophilen verkomplizieren die komplexen morphologischen Kriterien eine Einordnung. Jedoch wurden alle Ausstriche in dieser Studie vom Autor selbst differenziert. Die ermittelten Durschnitte der Variationskoeffizienten von einem Präparat, welches zehnmal an zehn verschiedenen Tagen differenziert wurde, ist in Tabelle 61 der aus der Literatur entnommenen VK gegenübergestellt. Die Differenzierung erfolgte immer am gleichen Arbeitsplatz. In der Tabelle stellen ¹ bis ³ Mittelwerte dar, ¹ und ² ergeben sich aus dem mehrmaligen Differenzieren eines Präparates, ³ wurden vom mehrmaligen Differenzieren zehn unterschiedlicher Präparate erhoben. Zusammenfassend erfolgten damit 100 Differenzierungen eines Präparates, welche zur Bestimmung der Inter- und Intraday-VK benutzt wurden. Darüber hinaus fanden insgesamt 300 Differenzierungen von 10 verschiedenen Präparaten zur Ermittlung des Intraday-VK's statt.

Diskussion

Tabelle 61: Verschiedene VK der Leukozyten-Differenzierung verglichen mit denen der Literatur

<i>Lymphozyten</i>	<i>Eosinophile</i>	<i>Basophile</i>	<i>Monozyten</i>	<i>Neutrophile</i>		<i>Referenz</i>
				<i>SeG</i>	<i>StaG</i>	
6,0	26,8	-	-	7,3	-	¹
6,3	27,0	-	-	7,8	-	²
11,0	63,7	-	-	6,9	-	³
20.0± 12.2	79.5± 48.8	133.6± 49.8	77.4± 35.6	13.1± 9.3		Giordano et al. (2008) ^a
32,5	68,8	263,2	55,0	6,6		Fuentes-Arderiu et al. (2007) ^b
10,3	27,7	110	22,5	5,3		Benattar und Flandrin (1999) ^c
15,36	-	-	-	-		Simson und Groner (1995) ^d

(zur besseren Vergleichbarkeit alle in %)

¹ Mittelwert von 10 Intraday-VK für einen Blutaussstrich 10-mal differenziert an 10 verschiedenen Tagen; ² Durchschnitt von 10 Interday-VK für einen Blutaussstrich 10-mal differenziert an 10 verschiedenen Tagen; ³ Durchschnitt von 10 Intraday-VK für 10 Blutaussstriche, welche jeweils 10-mal an 3 verschiedenen Tagen differenziert wurden;

^a –100 oder 200 Zellen differenziert von Pferden (N=114) von 3 unterschiedlichen Untersuchern ; ^b – 100 Zellen differenziert von 58 Blutaussstrichpaaren von 2 Untersuchern; ^c – 500 Zellen differenziert von mittels „wedge-Technik“ angefertigten Blutaussstrichen (N=7) von der gleichen Blutprobe; ^d – 2x 200 Zellen Referenzmethode für das Differentialblutbild (absolute Werte durch Multiplikation mit automatisiert bestimmten WBC) von N=697

Wenn nur ein Präparat differenziert wird, könnte möglicherweise das Problem bestehen, dass der Untersucher mit einer höheren Wahrscheinlichkeit einen sehr ähnlichen „Weg“ durch das Präparat mikroskopiert und dadurch eine bessere Reproduzierbarkeit erreicht. Verschärft würde dies möglicherweise noch durch ein Belassen des Objektträgers auf dem Objektisch zwischen 2 Mikroskopier-Durchgängen. In dieser Studie wurde u.a. ein zufällig ausgewähltes Präparat 10-mal an 10 verschiedenen Tagen mikroskopiert. Trotz immer neuen Einlegens des Objektträgers und einer immer neuen objektiven manuellen Differenzierung kann eine fälschlich bessere Reproduzierbarkeit durch ähnliche „Wege“ nicht ganz ausgeschlossen werden. Zudem kann eine bessere Präzision mit weniger Untersuchern und mehr ausgezählten Zellen erreicht werden. Außerdem ist die Interday-Variation, wie zu erwarten, größer als die Intraday-Variation. Im Unterschied zu anderen Studien wurden diese Präparate zufällig ausgewählt und stammen von gesunden wie auch kranken Tieren, was eine für die Praxis realistischere Grundvoraussetzung bietet.

5.2 Dynamiken des Weißen Blutbildes im Laktationsverlauf

Während des Lebens einer adulten Milchkuh durchläuft diese immer wieder den Zyklus von Trächtigkeit, Abkalbung, Laktation und erneute Trächtigkeit, Trockenstellen, Abkalbung etc. An diese einzelnen Stadien angepasst ist die Haltung, Fütterung und geforderte Leistung der Milchrinder. Daraus lässt sich ableiten, dass möglicherweise auch die vitalen Parameter der Kühe, speziell die Leukozyten, ebenfalls einem Zyklus unterliegen oder zumindest sich einigen Zyklus- bzw. Laktationsphasen anpassen. Zum Beispiel ist die Transitphase eine besonders anspruchsvolle, welche von hohem Kalziumbedarf, negativer Energiebilanz, Regeneration des Uterus und nicht zuletzt hoher Krankheitsinzidenz und -schwere gekennzeichnet ist (Sordillo und Raphael, 2013). Dies lässt auf veränderte Anzeichen im Blutbild schließen, was in dieser Studie bei Hochleistungskühen (>12.000 kg Milch/a) untersucht wurde.

Diese Veränderungen umfassen die nachfolgenden Dynamiken, welche in dieser Studie mit hoher Ähnlichkeit ebenfalls beschrieben wurden. Bereits von verschiedenen Autoren (Merrill und Smith, 1954; Paterson, 1957; Guidry et al., 1976; Saad et al., 1989; Lee und Kehrl, 1998; Klinkon und Zadnik, 1999) wurde um die Geburt ein Anstieg oder gar ein Maximum der WBC und Neutrophilen sowie ein Abfall der Lymphozyten und Eosinophilen dokumentiert. Daraufgehend sind typische Veränderungen 5 bis 8d p.p.: Sinkende WBC und Neutrophile sowie steigende Lymphozyten, Monozyten und Eosinophile. Die in dieser Studie gefundene Dynamik der Leukozyten sind mit den Ergebnissen der Literatur vergleichbar. Um die Geburt herum sind jedoch die Abstände der Beprobungstage etwas größer, wodurch ein so präziser Verlauf, wie beispielsweise bei Merrill und Smith (1954) ermittelt, nicht aufgezeigt werden kann. Am Tag der Abkalbung wurden keine Blutproben entnommen. Zudem wurden hier die Neutrophilen noch zusätzlich in segment- und stabkernige unterteilt. Allerdings sind die durchschnittlichen Werte der segmentkernigen Neutrophilen wie in der Literatur 14d a.p. höher (ca. 42,7 + 1,1%) gegenüber 3d p.p. (ca. 36,3 + 5,1%). Ein Maximum der Neutrophilen (segmentkernige + stabkernige) wurde gegebenenfalls durch die fehlende Beprobung am Tag des Partus verpasst, jedoch konnte der sich anschließende Abfall gut dargestellt werden. Die in diesen Untersuchungen auffallenden Veränderungen der stabkernigen Neutrophilen umfassen 14d a.p. einen vergleichsweise niedrigen durchschnittlichen Wert (1,1%) sowie einen maximalen 3d p.p. (5,1%). Dies könnte in Verbindung mit den eher niedrigen Werten der segmentkernigen Neutrophilen 3d p.p. für eine Linksverschiebung vom regenerativen Typ hinweisend sein. Möglicherweise herrscht in dieser Zeit aufgrund des Geburtsstresses, der starken metabolischen Belastung sowie der starken Belastung des Immunsystems physiologischerweise eine erhöhte Regeneration der Neutrophilen, um diese Abwehrschwäche zu überwinden. Bei den Lymphozyten hingegen wurden 14d a.p. bereits niedrige Werte (49,7%) ermittelt, 3d p.p. höhere Werte (54,9%). Damit war ein rascher

Diskussion

Anstieg zu verzeichnen. Saad et al. (1989) wiesen 1d a.p. die niedrigsten Lymphozytenwerte nach. Bei den eosinophilen Granulozyten sind erneut mit der Literatur vergleichbare Dynamiken zu erkennen: 14d a.p. höhere (5,8%) und 3d p.p. niedrigere Werte (2,4%) spiegeln wahrscheinlich den in der Literatur beschriebenen Abfall der Eosinophilen um die Geburt herum wider. Man hätte wahrscheinlich bereits eine wieder steigende Tendenz 3d p.p. mit einer zusätzlichen Bestimmung am Abkalbetag nachweisen können, da an diesem der Tiefpunkt zu erwarten gewesen wäre. Sowohl Corticosteroide als auch Katecholamine, deren Ausschüttung durch Stress erhöht wird, führen typischerweise zu einer Eosinopenie. Diese kann auch durch exogene Administration hervorgerufen werden (Schalm et al., 1975; Wittek, 2002).

Bei den Monozyten sind, ähnlich zur Literatur, bereits 3d p.p. signifikant erhöhte Werte zu sehen, welche schnell wieder bis 8d p.p. absinken.

Die veränderte Immunabwehr zeigt sich auch in einer hohen Phagozytose-Aktivität der Neutrophilen vor und einer niedrigen bereits kurz nach der Kalbung (Guidry et al., 1976). Neben der Phagozytose-Aktivität sind auch weitere Funktionen der Neutrophilen stark erniedrigt wie beispielsweise die zufällige Migration oder Bildung der ROS (Kehrli et al., 1989; Ingvarlsen und Moyes, 2015). Die Gründe für diese Immunschwäche scheinen vielfältig und komplex zu sein. In dieser Multikausalität scheinen niedrige Glukoselevel, möglicherweise hohe Ketonkörper- und NEFA-Konzentration und hohe Cortisonspiegel zur Geburt bzw. in der postpartalen Zeit, eine wichtige Rolle zu spielen (Galvão et al., 2010; Ster et al., 2012; Ingvarlsen und Moyes, 2015).

5.3 Referenzwerte

5.3.1 Allgemeine Referenzwerte

Bei den Referenzwerten sieht man über die Jahre zum Teil unterschiedliche Werte, was an verschiedenen Rinderpopulationen, Bestimmungsverfahren und der Berechnung liegt. Des Weiteren können veränderte Haltungs- und Fütterungsbedingungen einen Einfluss besitzen (Barnouin et al., 2004; Ingvarlsen und Moyes, 2012). Auch die fortschreitende Eradikation von Infektionskrankheiten, wie BVD oder BLV tragen zur Veränderung bei (Moennig und Greiser-Wilke, 2003; Moennig et al., 2005; Esteban et al., 2009; Schirrmeyer, 2014). Höhere Neutrophile und niedrigere Lymphozytenhäufigkeiten sind in den Arbeiten des 21. Jahrhunderts sowie in dieser Studie zu verzeichnen. Das bedingt auch ein höheres N:L-Verhältnis. Die Referenzintervalle der Eosinophilen zeigen ebenfalls eine Entwicklung hin zu niedrigeren Werten. Diese Veränderungen sind wahrscheinlich durch die stets erfolgte und erfolgende genetische Selektion der Population der Milchrinder, in Verbindung mit höheren Leistungsanforderungen, zu erklären. Es sollten immer aktuelle Referenzintervalle verwendet werden, um pathologische Befunde richtig von physiologischen abgrenzen zu können. Mit

Diskussion

Hinblick auf die Fehleranfälligkeit der manuellen wie auch automatisierten Analyseverfahren sollten Interpretationen nur zusammen mit Anamnese und klinischen Untersuchungen erfolgen und somit nur dieses Gesamtbild der klinischen Entscheidungsfindung dienen. Einen Vergleich zwischen aktuellen Referenzwerten und denen dieser Studie soll Tabelle 62 bieten. George et al. (2010) bestimmten die WBC mittels AVIDA 120 und das Differentialblutbild durch manuelle Differenzierung von 200 Zellen bei 58 BLV-negativen Kühen. Herman et al. (2018) bestimmten die WBC mittels des Sysmex XT-2000iV Blutanalysegerätes und das Differentialblutbild u.a. durch die manuelle Differenzierung von 100 Zellen bei 152 BLV-freien Kühen. Bei Moritz et al. (2013b) wurden die WBC durch manuelle Auszählung und das Differentialblutbild durch manuelle Differenzierung bestimmt. Absolute Werte der Leukozyten-Fractionen wurden bei allen drei Studien sowie bei dieser Studie aus WBC und relativen Werten berechnet. Bei der Ermittlung der Referenzintervalle wurden in dieser Studie nicht parametrische Verfahren genutzt, bei normalverteilten Parametern zusätzlich auch parametrische. Jedoch empfehlen Friedrichs et al. (2012) ab einer Anzahl von über 120 Referenzindividuen immer die Verwendung nicht parametrischer Werte, weshalb diese bevorzugend genutzt werden sollten.

In dieser Studie durchgeführte Untersuchungen betreffen nur Milchrinder eines Bestandes. Aufgestellte Referenzwerte sind als bestandsspezifisch anzusehen. Jedoch bestehen zumeist keine großen Unterschiede bei den hämatologischen Parametern zwischen unterschiedlichen Farmen (Lumsden et al., 1980). Die Kühe in Deutschland gelten als Brucellose und Rinderleukose (BLV) frei, aufgrund langjährig bestehender, obligatorischer amtlicher Überwachungs- und Bekämpfungsprogramme. Eine Untersuchung auf mögliche andere Infektionen mit vermuteter immunsupprimierender Wirkung, z.B. Bovines respiratorisches Synzytialvirus oder Paratuberkulose fand nicht statt. Klinische Anzeichen solcher Infektionen waren nicht vorhanden. Eine mögliche Anwendung immunsupprimierender Medikamente beispielsweise Glucocorticoide oder das Immunsystem stimulierende Vakzination wurden nicht berücksichtigt. Medikamente mit primärer immunmodulatorischer Wirkung wurden nicht eingesetzt. Während der Untersuchungen wurden Kühe in mehreren Laktationsstadien beprobt, signifikant unterschiedliche Beprobungstage wurden zum Erstellen der allgemeinen Referenzwerte ausgeschlossen. In den 2 Untersuchungszeiträumen, mit Probenerhebung an 3 im ersten und an 6 unterschiedlichen Tagen im zweiten Zeitraum, wurden insgesamt 766 Blutproben ausgewertet. Diese wurden von 192 einbezogenen Hochleistungsmilchkühen (>12.000 kg Milch/a) zu verschiedenen Zeitpunkten der Laktation entnommen. Die Rinder waren ausschließlich der Rasse Schwarzbunte bzw. Holstein-Friesian angehörig. Zu Beginn der Studie wurden nur gesunde Kühe ausgewählt, jedoch können zu späteren Zeitpunkten auch pathologische Prozesse aufgetreten sein, was einen klaren Nachteil bei der Aufstellung von

Diskussion

Referenzintervalle darstellt. Bei dem Vergleich der Intervalle mit denen von George et al. (2010) ist zu beachten, dass dort 200 Zellen ausgezählt wurden und nach Rümke et al. (1975) damit von Natur aus gewisse Unterschiede aufweisen. Außerdem kann es durch die Herstellung der Blutausrichre zu einer Ungleichverteilung der Leukozyten kommen, was vor allem große Lymphozyten und Monozyten betrifft. Diese finden sich häufig am Rand und in der Fahne der Präparate wieder, was zu einer deutlichen Unterschätzung deren Häufigkeit (ca. 5 bis 10%) führen kann (Stiene-Martin, 1980; Houwen, 2002). Dieses Phänomen könnte auch in dieser Studie vorliegen, zumal ein geringeres Referenzintervall für Monozyten als in der ausgewählten Vergleichsliteratur aufgestellt wurde. Mitunter berührte auch der Blutfilm den Rand des Objektträgers, was eine ungleichmäßige Verteilung noch begünstigt haben könnte.

Referenzintervalle können auch abhängig von Rasse und Geschlecht sein, eine Verwendung von besonders kuhspezifischen Referenzintervallen kann von Vorteil sein.

Tabelle 62: Aktuelle Referenzintervalle (in %) der Literatur und dieser Studie im Überblick

	<i>Referenzwerte der UC Davis 2001 modifiziert (George et al., 2010)</i>	<i>Referenzwerte nach Moritz et al. (2013b)</i>	<i>Referenzwerte nach Herman et al. (2018)</i>	<i>Referenzwerte dieser Studie</i>
Lymphozyten	54,7-66,7 ^a	45-65	27,8-86,1 ^b	28,4-74,9 ^a
Neutrophile	21,4-75,0 ^a	25-45	9,7-70,8 ^b	18,7-65,5 ^a
Stabkernige	-	0-3	-	0-8,0 ^b
Eosinophile	0-10,7 ^a	1-10	1,4-30,6 ^b	0-13,7 ^b
Basophile	0-3,6 ^b	0-2	0-2,8 ^b	0-2 ^b
Monozyten	0-9,5 ^a	2-6	1,4-11,1 ^b	0-3 ^b

^a parametrisch ^b 95%-Intervall

Tabelle 63: Aktuelle Referenzintervalle (in Gpt/l) der Literatur und dieser Studie im Überblick

	<i>Referenzwerte der UC Davis 2001 modifiziert (George et al., 2010)</i>	<i>Referenzwerte nach Moritz et al. (2013b)</i>	<i>Referenzwerte nach Herman et al. (2018)</i>	<i>Referenzwerte dieser Studie</i>
WBC	4,9-12,0 ^a	5-10	4,4-10,8 ^b	2,8-10,6 ^a
Lymphozyten	4,6-5,6 ^a	2,5-5,5	2,0-6,2 ^b	1,4-5,0 ^a
Neutrophile	1,8-6,3 ^a	1,0-3,5	0,7-5,1 ^b	0,2-5,3 ^a
Stabkernige	„rare“	0-0,2	-	0-0,5 ^b
Eosinophile	0-0,9 ^a	0,3-1,5	0,1-2,2 ^b	0-1,0 ^b
Basophile	0-0,3 ^b	0-0,1	0,0-0,2 ^b	0-0,1 ^b
Monozyten	0-0,8 ^a	0-0,3	0,1-0,8 ^b	0-0,2 ^b

^a parametrisch ^b 95%-Intervall

5.3.2 Referenzwerte im Laktationsverlauf

Diese Studie stellt für WBC, Lymphozyten, segmentkernige und stabkernige Neutrophile sowie für Eosinophile eine signifikante Abhängigkeit vom Laktationsstadium fest. Jedoch sind diese Unterschiede hauptsächlich im peripartalem Zeitraum bei den Proben von 14d a.p. und 3d sowie 8d p.p. zu erkennen. Vor allem WBC, stabkernige Neutrophile und Eosinophile zeigten dabei höchst signifikante Unterschiede. Für die übrigen Laktationsstadien fallen die Veränderung des Weißen Blutbildes eher gering aus. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Detilleux et al. (1995) in ihren Studien. Nazifi et al. (2008) wiesen außerdem einen signifikanten Unterschied im Differentialblutbild von Kühen 25-30d p.p. und bereits wieder trächtigen 55-65d p.p. nach. Im ersten Untersuchungszeitraum wurden zu einer geringeren Anzahl an Zeitpunkten Blutproben entnommen. Dadurch sind 3d und 100d p.p. deutlich weniger Proben analysiert worden. Dies führt auch zu einer statistisch geringeren Aussagekraft an diesen Tagen.

Die Multikausalität, die zur Immunsuppression in der Transitphase und insbesondere zur Kalbung führt, ist noch nicht vollends verstanden und bedarf weiterer Forschungen. Ein höherer Bedarf an Neutrophilen p.p. mit regenerativer Linksverschiebung scheint hauptsächlich von Änderungen im Hormonspiegel, hoher Stoffwechselbelastung sowie

Diskussion

hohem Keimdruck im Euter und Reproduktionstrakt abzuhängen (Smith und Merrill, 1954; Gunnink, 1984; Zerbe et al., 2000; Sheldon et al., 2006; Islam et al., 2014). Eine norwegische Studie fand bei Kühen mit besonders geringer Mastitis-Inzidenz niedrige Häufigkeiten der Neutrophilen und der WBC a.p. (Kulberg et al., 2002). Eine überschießende Reaktion des Immunsystems vor der Geburt könnte zu einem höheren Verbrauch der Immunzellen führen, welche postpartal in einer Phase des höheren Bedarfs dann umso mehr fehlen. Eigene Referenzwerte für den peripartalen Zeitraum erscheinen sinnvoll, da typische Veränderungen im Blutbild in diesem Zeitraum stattfinden und eine Interpretation mit den üblichen Referenzintervallen zu Fehlern führen können.

Dies kann die Entscheidungsfindung erleichtern, v.a. beim Vorliegen einer möglichen Neutrophilie, Lymphopenie oder Eosinopenie. Insbesondere kann in diesen Phasen, aber auch allgemein die Berechnung des N:L-Verhältnisses von besonderem Nutzen sein (Weiss und Wardrop, 2011; Weaver et al., 2018).

5.4 Weißes Blutbild und Futteraufnahme

Rinder mit schmerzhaften Leiden fressen deutlich weniger. Zusätzlich kommt es durch geringere Futteraufnahme schnell zu weiteren Veränderungen v.a. im Energie- und Mineralhaushalt (Glucose, Ketonkörper, NEFA, Kalium) dieser Kühe. Bei entzündlichen Erkrankungen kommt es ebenfalls in relativ kurzer Zeit zu einer Änderung im Differentialblutbild. In dieser Studie wurde deshalb ein Zusammenhang zwischen TS-Aufnahme sowie Pansenfüllung und dem Weißen Blutbild untersucht. Jedoch wurden bei der TS-Aufnahme keine nennenswerten Korrelationen entdeckt. Ähnliche Ergebnisse lieferten die statistischen Untersuchungen zwischen Pansenfüllung und Differentialblutbild. Allerdings wurde 3d p.p. eine geringe positive Korrelation zwischen segmentkernigen Neutrophilen und der Pansenfüllung sowie eine geringe negative Korrelation zwischen Lymphozyten und der Pansenfüllung ermittelt. Bei entzündlichen Prozessen kann ein Abfall der segmentkernigen Neutrophilen vorkommen, eine gesenkte Futteraufnahme könnte durch ein vermindertes Wohlbefinden aufgrund dieser Prozesse bedingt sein. Untersuchungen von Meglia et al. (2005) konnten in einem Fütterungsversuch von trockenstehenden Milchkühen nur sehr geringe Einflüsse der Zusammensetzung und Menge der Ration auf die Anzahl und Funktion der Leukozyten p.p. nachweisen. Es werden noch weitere Studien benötigt, um den Einfluss der Fütterung auf die Immunantwort besser zu verstehen. Ingvarlsen und Moyes (2012) propagieren die Beachtung der physiologischen Imbalance (PI) und deren Auswirkung auf die Immunkompetenz der Milchkühe speziell im peripartalen Zeitraum. Mit Hilfe der PI und darauf abgestimmter, verbesserter Fütterung kann eine bessere Immunantwort und geringere Stoffwechselbelastung zur besseren Krankheitsprävention von Transitkühen führen (Ingvarlsen, 2006; Ingvarlsen und Moyes, 2015). Kernkomponenten, die für die PI Berechnung ermittelt werden müssen, sind NEFA, BHB und Glucose.

5.5 Weißes Blutbild und ausgewählte Erkrankungen

Die typischen Erkrankungen der Milchrinder v.a. im peripartalen Zeitraum sind Zeichen einer erhöhten Belastung des Immunsystems und des Stoffwechsels. In dieser Studie wurden deshalb auf Korrelationen zwischen den Leukozyten und Stoffwechselfparameter BHB und NEFA sowie die Wahrscheinlichkeit für Stoffwechselerkrankungen, Klauenerkrankungen, Mastitiden und Fruchtbarkeitsstörungen berechnet. Zusätzlich wurde untersucht, ob das Differentialblutbild prognostische Aussagen über NGV zulässt und ob NGV einen Einfluss auf das postpartale Weiße Blutbild besitzt.

5.5.1 Stoffwechselerkrankungen (BHB, NEFA)

Für BHB und NEFA wurden lediglich geringe Korrelation gefunden. Die 2d oder 3d p.p. gemessenen BHB- und NEFA-Werte wiesen geringe negative Korrelationen mit den WBC und segmentkernigen Neutrophilen 8 bzw. 28d p.p. auf. Die Ergebnisse könnten ein Hinweis für den negativen Einfluss der Ketonkörper bzw. NEFA auf die Immunantwort der Rinder sein. Auch der negative Einfluss von BHB und NEFA auf die Aktivität der Leukozyten, speziell auf die Neutrophilen ist bereits zahlreich untersucht worden und mehr oder weniger deutlich nachgewiesen (Ingvarsen und Moyes, 2015). Eine erhöhte Anzahl an Lymphozyten in Kühen mit erhöhten BHB-Werten wie in den Ergebnissen der Untersuchungen von Schulz et al. (2015), konnte in dieser Studie nicht belegt werden.

Zusätzliche statistische Untersuchungen fanden bei Milchrindern mit Stoffwechselerkrankung (Hypokalzämie, Ketose, DLA) statt. Dabei schienen Kühe mit einer vermehrten Anzahl an eosinophilen Granulozyten 28d p.p. ein signifikant geringeres Risiko zu besitzen, Stoffwechselerkrankungen auszubilden. Martinez et al. (2012) konnten nachweisen, dass Kühe mit subklinischer Hypokalzämie erhöhte BHB- und NEFA- Werte aufwiesen sowie ein höheres Risiko an Metritis zu erkranken, besaßen. Zudem zeigten die Neutrophilen dieser Rinder eine niedrige Aktivität wie Migration oder Phagozytose. Immunzellen scheinen hauptsächlich Glucose als Metabolit für die Energiegewinnung zu nutzen, außerdem können sie Glutamin oder Tricarbonsäuren verwenden (Pearce und Pearce, 2013). Untersuchungen bei Labormäusen suggerieren, dass Ketonkörper nicht als Energiequelle der Leukozyten dienen, NEFA's jedoch möglicherweise schon (Newsholme et al., 1987). Jedoch konstatierten einige Studien negative Auswirkungen auf die Aktivität von Neutrophilen beim Rind (Scalia et al., 2006; Hammon et al., 2006; Ster et al., 2012).

5.5.2 Fruchtbarkeitsstörungen

Rinder mit niedrigen WBC 8d p.p. und niedrigen segmentkernigen Neutrophilen haben scheinbar eine höhere Wahrscheinlichkeit, Fruchtbarkeitsstörungen auszubilden. Höhere Anzahlen an Lymphozyten und stabkernige Neutrophile 8d p.p. scheinen jedoch die

Diskussion

Wahrscheinlichkeit, dass Milchrinder Fruchtbarkeitsstörungen zeigen, zu verringern. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für die 3d p.p. gemessenen Leukozytenhäufigkeiten gemacht. Damit könnte eine höhere Nachbildung der Neutrophilen sowie ein niedriges N:L-Verhältnis eine protektive Wirkung vor Fruchtbarkeitsstörungen besitzen. Kim et al. (2005a) beobachteten bei einer Studie über Endometritis neben höheren Serumwerten von TNF- α auch erhöhte WBC, Lymphozyten, Monozyten, jedoch auch Neutrophile (ohne Unterscheidung zwischen deren Alter). Außerdem stellte sich eine erniedrigte Phagozytoseaktivität der Leukozyten a.p. als Risikofaktor für Endometritiden p.p. dar.

5.5.3 Retentio secundinarum

Mittels logistischer Regression konnte kein signifikanter Zusammenhang des Differentialblutbildes a.p. mit dem NGV p.p. nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden betroffene Kühe auf Zusammenhänge zwischen Retentio secundinarum und dem Differentialblutbild an allen Beprobungstagen untersucht. Dabei fanden t-Tests bzw. Mann-Whitney-U-Tests signifikante Einflüsse der NGV auf das Weiße Blutbild. Eine höchst signifikante Erhöhung der Neutrophilen sowie erniedrigte Lymphozyten wurden bei erkrankten Rindern festgestellt. Außerdem hatten betroffene Kühe sich signifikant unterscheidende WBC-Werte. Moretti et al. (2015) fanden jedoch deutlich erniedrigte neutrophile Granulozyten in Kühen mit NGV und konnten diese Ergebnisse in einer weiteren Studie wiederholen und präzisieren. So zeigten gesunde Rinder, wie auch erkrankte eine Neutropenie zur Abkalbung, jedoch konnte in der Kontrollgruppe ein schnellerer Anstieg der Neutrophilen verzeichnet werden im Gegensatz zu Milchkühen mit NGV (Moretti et al., 2016). Die Ergebnisse dieser Studie betreffen einen anderen Zeitraum von 8d p.p. im Unterschied zu Moretti et al. (2016), welche bis 12h und zwischen 48 und 72h Studienkühe beprobten. In dieser Studie wurden auch 3d p.p. Rinder beprobt, jedoch nur im 2. Untersuchungszeitraum Blutbilder erstellt. Aufgrund dessen konnten nur wenige erkrankte Kühe 3d p.p. einbezogen werden, was die statistische Aussagekraft senkt. Möglicherweise wären mit einer größeren Anzahl an einbezogenen Studienkühen 3d p.p. ähnliche Ergebnisse erzielt worden. Die Funktion der Neutrophilen scheint, im Zusammenhang mit gesenkter IL-8 Produktion, ebenfalls eine wichtige Ursache für die Entwicklung von NGV bei Kühen zu sein (Kimura et al., 2002). Laut Moretti et al. (2016) eignet sich das Differentialblutbild als prognostischer Indikator für Milchkühe mit hohem Risiko an Retentio secundinarum zu erkranken. Jedoch ist unklar, ob Neutropenie der Grund oder nur ein erstes Anzeichen des Syndroms einer NGV ist (Moretti et al., 2015). Dervishi et al. (2016) wiesen bei Kühen, welche NGV entwickelten bereits 8 und 4 Wochen a.p. erhöhte Serumwerte von Laktat, IL-1, IL-6, TNF und SAA nach.

5.5.4 Totgeburt

Bei Kühen mit Totgeburten wurde untersucht, ob das Differentialblutbild 14d a.p. statistisch gesicherte Veränderungen zeigte. Jedoch wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt. Allerdings waren wenige Studientiere von Infans mortuus betroffen. Chassagne et al. (1999) fanden in ihren Untersuchungen heraus, dass eine Anzahl an Neutrophilen $> 1950/\text{mm}^3$ (1,95 Gpt/l) a.p. mit einem niedrigeren Risiko für Holstein-Rinder, Totgeburten zu erleiden, einherging. In den eigenen Untersuchungen wurden ohne signifikanten Einfluss, jedoch numerisch betrachtet, niedrige segmentkernige Neutrophile a.p. mit einem höheren Risiko für Totgeburten assoziiert, welches mit den Ergebnissen der Literatur übereinstimmen könnte.

5.5.5 Klauenerkrankungen und Mastitiden

Bei Kühen, welche Klauenerkrankungen ausbildeten, konnte kein signifikanter Zusammenhang zu den Leukozyten im Laktationsverlauf nachgewiesen werden. Für Mastitiden wurden keine Berechnungen durchgeführt, da zu wenig Kühe mit dieser Diagnose an den einzelnen Beprobungstagen einbezogen werden konnten.

5.5.6 Interventionsmöglichkeiten gegen die peripartale Immunsuppression

Zur Verminderung der auf den Milchrindern lastenden negativen Einflüsse in der Transitphase sind zahlreiche Haltungs-, Managements- und Fütterungsmaßnahmen publiziert. Diese können alle zu einer besseren Immunkompetenz der Rinder beitragen. Dabei kann insbesondere eine Kombination aus der Kontrolle der Körperkondition mit angepasster Fütterung a.p. und Ketonkörper-Messung mit ggf. Substitution von Propylenglykol oder Glycerol p.p., einer Ketose und dem Fettmobilisationssyndrom vorbeugen (Edmonson et al., 1989; Drackley, 1999b; Staufenbiel und Schröder, 2004; Barthmann, 2004; Goff und Horst, 2001). Des Weiteren sind Prophylaxemaßnahmen zur Verminderung der klinischen und subklinischen Hypokalzämie, welche als Türöffner für zahlreiche Erkrankungen gilt, sinnvoll. Dies kann mit den sog. sauren Salzen in Form einer Anionen-Ration geschehen. Hintergrund dieser Strategie sind die Arbeiten von Craige und Stoll (1947), welche Alkalose als Ursache für Milchfieber identifizierten sowie die von Goff und Horst (1997a), in denen demonstriert wurde, dass häufig eine kaliumreiche Fütterung zur Alkalose führt. Bushinsky (1996) schließlich spezifizierte die Rolle des Säure-Basen-Haushaltes im Kalzium-Stoffwechsel, insbesondere die Veränderung der PTH-Rezeptor-Sensitivität durch die erfolgende Alkalisierung. Die Folge war eine Entwicklung zahlreicher Fütterungsregime, welche nicht nur die Milchfieberinzidenz senkten, sondern auch die Reproduktion und Herdengesundheit verbesserten, jedoch ein anspruchsvolles Management erfordern (Staufenbiel et al., 2004b; Razzaghi et al., 2012). Andere Maßnahmen zur Milchfieberprophylaxe umfassen die Gabe von Kalziumboli unmittelbar p.p., die Vitamin D-

Diskussion

Substitution oder die Calcitonin-Injektion in Verbindung mit einer Anionen-Ration (Horst et al., 2003; Oetzel und Miller, 2012; Vieira-Neto et al., 2017). Darüber hinaus sollte auf eine generelle Vermeidung von Stress, sei er beispielsweise durch Neuordnung der aufgestellten Rinder oder durch Hitze bedingt, geachtet werden. Zukünftig können immunmodulatorische Pharmaka, welche sich exemplarisch mit Pegbovigrastim erst am Beginn ihrer Entwicklung befinden, die Immunabwehr der Milchkühe zusätzlich stärken.

6 Schlussfolgerungen

- Die Präzision der manuellen Leukozyten-Differenzierung liegt für Lymphozyten, segmentkernigen Neutrophilen sowie für Eosinophile Granulozyten im akzeptablen Bereich. Bei Leukozyten mit geringem Vorkommen, wie z.B. basophile Granulozyten, stabkernige Granulozyten und Monozyten ist die Präzision deutlich kleiner.
- Stabkernige neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten sowie Monozyten zeigen eine signifikante Laktationsdynamik.
- Die Laktationsdynamik ist bei den Leukozyten mit höheren methodischen Fehlern am ausgeprägtesten. Die Ursache darin liegt in ihrem seltenen und sprunghaften Vorkommen.
- Die Leukozytenwerte zeigen zwar signifikante Unterschiede im Laktationsverlauf, jedoch liegen die Medianwerte und überwiegend auch das erste und dritte Quartil innerhalb der in Deutschland üblichen Referenzintervall von Moritz et al. (2013b). Dies kann auch in Beziehung mit der gut gemanagten Herde stehen, die eine hohe Milchleistung bei geringer Krankheitsinzidenz zeigte.
- Insgesamt kann die Laktationsdynamik als geringgradig ausgeprägt eingestuft werden, welche nicht eigene Referenzintervalle erfordert. Am ehesten würden eigene Referenzintervalle jedoch in der unmittelbaren peripartalen Phase von Nutzen sein.
- Von Vorteil ist eine Verwendung von Intervallen einer Referenzpopulation, welche den zu untersuchenden Kühen besonders nahekommen. In dieser Studie dienten beispielsweise adulte weibliche Hochleistungsrinder der Rasse Holstein-Friesian.
- Die in dieser Studie bestimmten bestandsspezifischen Referenzintervalle passen sich denen in der Literatur publizierten von George et al. (2010) und Herman et al. (2018) gut an. Zu denen in Deutschland üblichen Intervallen von Moritz et al. (2013b) bestehen hingegen auch gewisse Unterschiede.
- Ante partum bestimmte Leukozytenwerte besitzen keine verwertbare Vorhersagekraft für die postpartale TS-Aufnahme, Pansenfüllung, BHB- und NEFA- Konzentrationen sowie Stoffwechselstörungen, Fruchtbarkeitsstörungen, Totgeburten, NGV und Klauenerkrankungen.
- Die postpartalen Leukozytenwerte weisen vereinzelt signifikante Zusammenhänge zu den Erkrankungen auf, welche jedoch ohne weitere praktische Relevanz bleiben.

Schlussfolgerungen

- In der Gesamtschau der Ergebnisse sind Leukozytenwerte weniger zur Erkennung von Bestandsproblemen geeignet, sondern stellen einen klassischen Parameter in der Diagnostik klinisch erkrankter Einzeltiere dar. Die Interpretation sollte aufgrund des breiten Referenzbereiches unbedingt im Zusammenhang mit Vorbericht, klinischen Befunden und Krankheitsverlauf geschehen.

7 Zusammenfassung

Untersuchungen zu den Veränderungen im Weißen Blutbild von Holstein Friesian Milchkühen 14 Tage ante partum bis 100 Tage post partum in Beziehung zur Futteraufnahme und ausgewählten Erkrankungen

Die hohe metabolische Beanspruchung der Milchkühe in der Transitphase, vor allem durch Geburt und negative Energiebilanz sowie deren Folgen für den Stoffwechsel, führen zu einer gesenkten Immunkompetenz der Tiere. Dies bedingt stets auch eine Veränderung im Weißen Blutbild.

Zielstellung der Studie war es, zum einen Zusammenhänge zwischen Änderungen der Futteraufnahme und dem Weißen Blutbild zu untersuchen. Zum anderen wurden der Einfluss der peripartalen Phase und die damit verbundenen Krankheiten auf das Weiße Blutbild überprüft. Die dabei untersuchten Assoziationen der Leukozyten mit anderen Parametern umfassen die TS-Aufnahme, die Pansenfüllung, BHB, NEFA, dem Komplex der Stoffwechselkrankheiten, Totgeburten, Retentio secundinarum und Fruchtbarkeitsstörungen. Darüber hinaus wurde die methodische Präzision der manuellen Leukozyten-Differenzierung kontrolliert. Zusätzlich erfolgte die Aufstellung von bestandsspezifischen Referenzintervallen für einzelne Laktationsstadien, da besonders im peripartalen Zeitraum höchst signifikante Unterschiede im Differentialblutbild zu verzeichnen sind. Schließlich wurden allgemeine Referenzintervalle berechnet.

Die Studie erfolgte auf einem konventionellen Milchviehbetrieb in Sachsen-Anhalt in zwei Untersuchungszeiträumen vom 04.05.2015 bis 07.04.2016 und 12.04.2016 bis 21.11.2016. Als Probanden fungierten hochleistende Holstein-Friesian-Kühe (>12.000 kg jährliche Milchleistung). Die Erhebung der Blutproben erfolgte im ersten Zeitraum an drei und im zweiten an sechs unterschiedlichen Tagen. Insgesamt wurden 766 Blutproben ausgewertet, welche von 192 einbezogenen, zu verschiedenen Laktationszeitpunkten mehrmals beprobten Milchkühen stammen. Die Herde gilt als frei von Brucellose und Rinderleukose (BVL). Die Differentialblutbilder wurden manuell durch Bestimmung von 100 Zellen aus gefärbten Ausstrichen erstellt. WBC wurden automatisiert mittels Impedanzmethode bestimmt.

Die Präzision der manuellen Differenzierung der Leukozyten wurde über Inter- und Intraday-Variationskoeffizienten dargestellt. Die Analyse der Blutausstriche wurde immer vom selben Untersucher und am selben Arbeitsplatz durchgeführt. Die methodische Präzision der manuellen Leukozyten-Differenzierung liegt für Lymphozyten, segmentkernigen Neutrophilen sowie für Eosinophile Granulozyten im akzeptablen Bereich. Bei Leukozyten mit geringem

Zusammenfassung

Vorkommen, wie bei basophilen Granulozyten, stabkernigen Granulozyten und Monozyten ist die Präzision deutlich kleiner.

Der Laktationsverlauf hatte einen signifikanten ($p < 0,05$) bis höchst ($p < 0,001$) signifikanten Einfluss auf den überwiegenden Teil der Leukozytenfraktionen. Besonders deutliche Dynamiken zeigten dabei die stabkernigen neutrophilen Granulozyten, die eosinophilen Granulozyten und die Monozyten. Im Laktationsverlauf ist der Abschnitt mit den deutlichsten Veränderungen der unmittelbare peripartale Zeitraum.

Im Differentialblutbild 14d a.p. sind die segmentkernigen Neutrophilen signifikant ($p < 0,05$) höher (42,7%) als 3d p.p. (36,3%). Die Stabkernigen treten in Abgrenzung dazu 14d a.p. in niedriger Zahl auf (1,1%) auf und erreichen 3d p.p. schließlich ihr Maximum (5,1%). Der relative Anteil der Lymphozyten lag 14d a.p. niedrig (49,7%) und steigt 3d p.p. bereits wieder an (54,9%). Die Ergebnisse verdeutlichen den Einfluss der Geburt auf die Leukozyten. Sie sind durch niedrige Lymphozyten a.p. und einem plötzlichen Abfall der Neutrophilen p.p. sowie einen damit verbundenen Anstieg der Stabkernigen gekennzeichnet.

Die Verwendung von spezifisch angepassten Referenzintervallen im Laktationsverlauf ist nicht nötig, da trotz Dynamik die Leukozytenwerte nicht wesentlich außerhalb der üblichen Referenzintervalle liegen.

Bei den in dieser Studie ermittelten herdespezifischen Referenzintervallen des gesamten Zeitraumes für hochleistende Milchrinder der Rasse Holstein Friesian wurden signifikant unterschiedliche Tage im Laktationsverlauf ausgeschlossen. Sie zeigen geringe Unterschiede zu den sonst üblicherweise in Deutschland verwendeten Referenzwerten von Moritz et al. (2013b).

Es sind gering positive Korrelationen zwischen segmentkernigen Neutrophilen und der Pansenfüllung sowie gering negative Korrelation zwischen Lymphozyten und Pansenfüllung 3d p.p. nachgewiesen worden. Zwischen TS-Aufnahme der Milchkühe und den Leukozyten im Laktationsverlauf bestanden keine Korrelationen. Für gemessene BHB und NEFA Serumwerte wurden 2d bzw. 3d p.p. geringe negative Korrelationen mit den WBC und segmentkernigen Neutrophilen 8 bzw. 28d p.p. berechnet.

Niedrige WBC und niedrige segmentkernige Neutrophile bei Milchkühen 8d p.p. sind scheinbar mit einer höheren Wahrscheinlichkeit verbunden, postpartale Fruchtbarkeitsstörungen auszubilden bzw. ausgebildet zu haben. Hingegen scheinen höhere Lymphozyten und stabkernige Neutrophile 8d p.p. die Wahrscheinlichkeit, dass Milchrinder Fruchtbarkeitstörungen zeigen, zu verringern. Es konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen Differentialblutbild a.p. mit der NGV p.p. nachgewiesen werden. Einen höchst signifikanten Zusammenhang mit NGV konnte jedoch im postpartalen Zeitraum gefunden

Zusammenfassung

werden. Erkrankte Milchkühe wiesen 8d p.p. eine Erhöhung der Neutrophilen sowie eine Verringerung der Lymphozyten gegenüber deren Mittelwerten auf.

Die gefundenen Assoziationen zu den Erkrankungen bleiben damit ohne besondere Relevanz für die Praxis.

In der Gesamtschau der Ergebnisse ist das Differentialblutbild weniger zur Erkennung von Bestandproblemen geeignet, sondern dient mehr als eine weiterführende Untersuchungsmethode in der Einzeltierdiagnostik. Die Interpretation muss aufgrund des breiten Referenzintervalls in Verbindung mit den klinischen Befunden erfolgen.

8 Summary

Changes in the white blood picture of high yielding Holstein Friesian cows 14 days ante partum to 100 days post partum in relation with feed intake and some selected diseases

The critical phase for dairy cows is the transition period at calving, involving hormonal changes, negative energy balance at the start of lactation, as well as nutritional changes. These changes are challenging for the immune system, resulting in a high disease incidence. This is reflected by typical leukocyte changes.

There were 5 objectives of this study:

- (1) To examine the relationship between feed intake and the differential hemogram with respect to its prognostic value.
- (2) The influence of the periparturient phase with associated diseases on the white blood differential were examined. The selected parameters include dry matter intake, rumen fill score, β -hydroxybutyrate (BHB), non-esterified fatty acids (NEFA), metabolic disorders, still birth, retained placenta, as well as reproduction disorders.
- (3) The precision of a manual leukocyte differential was verified.
- (4) Reference intervals were created for different time points during lactation. Significant changes have been observed around calving.
- (5) General farm specific reference intervals for high yielding dairy cows have been established with exclusion of those sampling dates which showed significant differences of specific leukocyte values in comparison with values of other sampling dates.

The study was conducted on a dairy farm in Saxony-Anhalt. It took place in two different periods, the first one from 04.05.2015 – 07.04.2016, and the second from 12.04.2016 – 21.11.2016. High yielding Holstein-Friesian cows (>12.000 kg annual milk yield) were used. Examination and sample collection were carried out by veterinarians on three different dates for each cow in the first period and six different dates in the second period. In all, 766 blood samples from different stages in lactation derived from 192 cows were evaluated. The herd is presumed to be free from brucellosis and bovine leukemia virus. The white blood cell differential was determined by counting and differentiating 100 leukocytes on stained blood smears. For the total number of WBC, automated analysis was used.

The precision of the manual method was evaluated by using an interday and intraday coefficient of variation. The manual analysis was always performed on the same workplace by the same examiner. The precision of the manual method is in an acceptable field for

Summary

lymphocytes, polymorphonuclear neutrophils, and eosinophils. Leukocytes with decreased appearance (basophils, bands, or monocytes) showed a lesser precision.

The stage in lactation showed a significant ($p < 0,001$) influence on most of the different leukocytes. Particularly band neutrophils, eosinophils, and monocytes showed notable dynamics during lactation, especially around calving.

The differential blood picture shows 14d ante partum (a.p.) significant ($p < 0,05$) increased (42,7%) polymorphic nuclear neutrophils compared with 3d post partum (p.p.) (36,3%). The band neutrophils instead are showing low numbers (1,1%) 14d a.p. and increase up to a maximum (5,1%) 3d p.p. The lymphocyte percentages are at low levels (49,7%) 14d a.p. and increases 3d p.p. (54,9%). These results illustrate the influence of calving on the leukocytes. The influence is characterized by low lymphocyte values before calving and a sudden decrease in polymorphonuclear neutrophils as well as the associated increase in band neutrophils after calving. The establishment of specific lactation adapted reference intervals are not necessary, because despite prominent dynamics, the leukocyte values did not lay considerably outside the common intervals.

In this study general leukocyte reference intervals were established for high yielding dairy Holstein-Friesian cows. Days in lactation with significant different values were excluded.

Furthermore, the polymorphonuclear neutrophils have been found positively correlated with the ruminal fill, and the lymphocytes are slightly negatively correlated with the rumen fill 3d p.p. A correlation has not been found of any leukocytes with the dry matter intake at any point in time during lactation. Besides, the serum values of NEFA and BHB showed a negative correlation with the 8d and 28d p.p. determined leukocytes and polymorphonuclear neutrophils. Cows with low WBC and polymorphonuclear neutrophils 8d p.p. seem to have a higher risk for reproduction disorders. However, higher lymphocyte and band neutrophil values seem to be protective against reproduction disorders. There has not been found a significant relation between the white blood cell differential a.p. and retained placenta. Cows with retained placenta showed highly significant increased neutrophils and decreased lymphocytes p.p.

To put it in a nutshell, those findings are of minor clinical relevance. The white blood cell differential does not appear to be the appropriate diagnostic method at herd level, but instead it is a diagnostic method for the individual cow. The interpreting of the leukogram must be under consideration of the results derived from the clinical examination.

9 Literaturverzeichnis

ABBASSI, O., KISHIMOTO, T., MCINTIRE, L. & SMITH, C. 1993.

Neutrophil adhesion to endothelial cells.

Blood Cells, 19, 245-260.

ABUJAMIEH, M., KVIDERA, S. K., FERNANDEZ, M. V., NAYERI, A., UPAH, N. C., NOLAN, E. A., LEI, S. M., DEFRAIN, J. M., GREEN, H. B., SCHOENBERG, K. M., TROUT, W. E. & BAUMGARD, L. H. 2016.

Inflammatory biomarkers are associated with ketosis in periparturient Holstein cows.

Research in Veterinary Science, 109, 81-85.

ADDISON & WILLIAM 1843.

Experimental and practical researches on inflammation : and on the origin and nature of tubercles of the lungs

London; Worcester, J. Churchill; Deighton.

ADDISON, W. 1841.

Colourless globules in the buffy coat of the blood.

London Medical Gazette, 27, 477.

ALLISON, R. W. & MEINKOTH, J. H. 2007.

Hematology Without the Numbers: In-Clinic Blood Film Evaluation.

Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 37, 245-266.

ANDERSON, B. H., WATSON, D. L. & COLDITZ, I. G. 1999.

The Effect of Dexamethasone on Some Immunological Parameters in Cattle.

Veterinary Research Communications, 23, 399-413.

ANDRAL, G. 1845.

Essai d'hématologie pathologique

Paris, Fortin, Masson.

APLIN, A. E., HOWE, A., ALAHARI, S. K. & JULIANO, R. L. 1998.

Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins.

Pharmacological Reviews 50, 197-263.

ARNETH, J. 1904.

Die neutrophilen Leukozyten bei Infektionskrankheiten.

DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 30, 54-56.

ATHENS, J., HAAB, O., RAAB, S., MAUER, A., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. & WINTROBE, M. 1961.

Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects.

The Journal of clinical investigation, 40, 989-995.

ATHENS, J. W., MAUER, A. M., ASHENBRUCKER, H., CARTWRIGHT, G. E. & WINTROBE, M. M. 1959.

Leukokinetic Studies. I. A Method for Labeling Leukocytes with Diisopropylfluorophosphate (DFP 32).

Blood, 14, 303-333.

Literaturverzeichnis

- BAIN, B. J. 1997.
Roche Grundkurs hämatologische Morphologie.
In: HUHNS, D. & KAGE, A. (eds.) Ex libris Roche. Berlin etc.: Blackwell Wissenschafts-Verlag.
- BARNETT, C. W. 1933.
The unavoidable error in the differential count of the leukocytes of the blood *The Journal of Clinical Investigation*, 12, 77-85.
- BARNOUIN, J., CHASSAGNE, M., BAZIN, S. & BOICHARD, D. 2004.
Management Practices from Questionnaire Surveys in Herds with Very Low Somatic Cell Score Through a National Mastitis Program in France.
Journal of Dairy Science, 87, 3989-3999.
- BARTHMANN, J. 2004.
Einfluss von Propylenglycol und Huminsäuren auf klinische und klinisch-chemische Daten von Milchkühen im peripartalen Zeitraum.
Dissertation, Universität Leipzig.
- BAUM, H. 2019a.
Färbung, Blutbild.
In: GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. (eds.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.
Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- BAUM, H. 2019b.
Zählkammer.
In: GRESSNER, A. M. & ARNDT, T. (eds.) Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik.
Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- BECKER, M., MORITZ, A. & GIGER, U. 2008.
Comparative clinical study of canine and feline total blood cell count results with seven in-clinic and two commercial laboratory hematology analyzers.
Veterinary Clinical Pathology, 37, 373-384.
- BEGEMANN, M. 1998.
Praktische Hämatologie: Klinik, Therapie, Methodik, Georg Thieme Verlag.
- BELIĆ, B., CINCOVIĆ, M. R., KRČMAR, L. & VIDOVIĆ, B. 2011.
Reference values and frequency distribution of hematological parameters in cows during lactation and in pregnancy.
Contemporary agriculture, 60, 145-151.
- BELL, F. N. & IRWIN, M. R. 1938.
Studies on the Variation of the Blood Cells of Cattle in Health and during Brucella Infections.
The Journal of Infectious Diseases, 63, 251-262.
- BENATTAR, L. & FLANDRIN, G. 1999.
Comparison of the classical manual pushed wedge films, with an improved automated method for making blood smears.
Hematology and Cell Therapy, 41, 211-215.
- BENSCHOP, R. J., RODRIGUEZ-FEUERHAHN, M. & SCHEDLOWSKI, M. 1996.
Catecholamine-Induced Leukocytosis: Early Observations, Current Research, and Future Directions.
Brain, Behavior, and Immunity, 10, 77-91.

Literaturverzeichnis

- BERGLUND, F., MARATHE, N. P., ÖSTERLUND, T., BENGTSSON-PALME, J., KOTSAKIS, S., FLACH, C.-F., LARSSON, D. G. J. & KRISTIANSSON, E. 2017.
Identification of 76 novel B1 metallo- β -lactamases through large-scale screening of genomic and metagenomic data.
Microbiome, 5, 134.
- BERKOW, R. L. & DODSON, R. W. 1987.
Functional analysis of the marginating pool of human polymorphonuclear leukocytes.
American Journal of Hematology 24, 47-54.
- BERKSON, J., MAGATH, T. B. & HURN, M. 1939.
The error of estimate of the blood cell count as made with the hemocytometer.
American Journal of Physiology-Legacy Content, 128, 309-323.
- BERNARD, A. & BOUMSELL, L. 1984.
The clusters of differentiation (CD) defined by the First International Workshop on human leucocyte differentiation antigens.
Human Immunology, 11, 1-10.
- BERTONI, G., TREVISI, E., HAN, X. & BIONAZ, M. 2008.
Effects of inflammatory conditions on liver activity in puerperium period and consequences for performance in dairy cows.
Journal of Dairy Science, 91, 3300-3310.
- BERTRAM, T. A. 1985.
Neutrophilic leukocyte structure and function in domestic animals.
Advances in veterinary science and comparative medicine, 30, 91-129.
- BIONAZ, M., TREVISI, E., CALAMARI, L., LIBRANDI, F., FERRARI, A. & BERTONI, G. 2007.
Plasma Paraoxonase, Health, Inflammatory Conditions, and Liver Function in Transition Dairy Cows.
Journal of Dairy Science, 90, 1740-1750.
- BLAND, M., ALTMAN, J. & DOUGLAS 1986.
statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement.
The Lancet, 327, 307-310.
- BLUM, J. W., DOSOGNE, H., HOEBEN, D., VANGROENWEGHE, F., HAMMON, H. M., BRUCKMAIER, R. M. & BURVENICH, C. 2000.
Tumor necrosis factor- α and nitrite/nitrate responses during acute mastitis induced by *Escherichia coli* infection and endotoxin in dairy cows.
Domestic Animal Endocrinology, 19, 223-235.
- BOISCLAIR, Y., GRIEVE, D. G., ALLEN, O. B. & CURTIS, R. A. 1987.
Effect of Prepartum Energy, Body Condition, and Sodium Bicarbonate on Health and Blood Metabolites of Holstein Cows in Early Lactation.
Journal of Dairy Science, 70, 2280-2290.
- BORCHARDT, S. & STAUFENBIEL, R. 2012.
Evaluation of the use of nonesterified fatty acids and beta-hydroxybutyrate concentrations in pooled serum samples for herd-based detection of subclinical ketosis in dairy cows during the first week after parturition.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 240, 1003-1011.

Literaturverzeichnis

- BOURNER, G., DE LA SALLE, B., GEORGE, T., TABE, Y., BAUM, H., CULP, N., KENG, T. B. & HEMATOLOGY, T. I. C. F. S. I. 2014.
ICSH guidelines for the verification and performance of automated cell counters for body fluids.
International Journal of Laboratory Hematology, 36, 598-612.
- BRAUN, U., WARISLOHNER, S., TORGERSON, P., NUSS, K. & GERSPACH, C. 2018.
Clinical and laboratory findings in 503 cattle with traumatic reticuloperitonitis.
BMC veterinary research, 14, 66-66.
- BRIDGER, P. S., BAUERFEIND, R., WENZEL, L., BAUER, N., MENGE, C., THIEL, H.-J., REINACHER, M. & DOLL, K. 2011.
Detection of colostrum-derived alloantibodies in calves with bovine neonatal pancytopenia.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 141, 1-10.
- BRODZKI, P., KOSTRO, K., KRAKOWSKI, L. & MARCZUK, J. 2015.
Inflammatory cytokine and acute phase protein concentrations in the peripheral blood and uterine washings of cows with subclinical endometritis in the late postpartum period.
Veterinary Research Communications, 39, 143-149.
- BROUGHTON, P. M. G., BUTTOLPH, M. A., GOWENLOCK, A. H., NEILL, D. W. & SKENTELBERY, R. G. 1969.
Recommended scheme for the evaluation of instruments for automatic analysis in the clinical biochemistry laboratory.
J Clin Pathol, 22, 278-84.
- BRUHN, H. D., JUNKER, R., SCHÄFER, H. & SCHREIBER, S. 2011a.
Hämatologie.
LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte Pathophysiologie und Klinik. Schattauer Verlag.
- BRUHN, H. D., JUNKER, R., SCHÄFER, H. & SCHREIBER, S. 2011b.
LaborMedizin: Indikationen, Methodik und Laborwerte Pathophysiologie und Klinik, Schattauer Verlag.
- BRYAN, W. R., CHASTAIN, L. L. & GARREY, W. E. 1935.
ERRORS OF ROUTINE ANALYSIS IN THE COUNTING OF LEUCOCYTES.
American Journal of Physiology-Legacy Content, 113, 416-429.
- BÜHL, A. 2014.
SPSS 22 Einführung in die moderne Datenanalyse
Hallbergmoos, Pearson.
- BURKE, C. R., MEIER, S., MCDOUGALL, S., COMPTON, C., MITCHELL, M. & ROCHE, J. R. 2010.
Relationships between endometritis and metabolic state during the transition period in pasture-grazed dairy cows.
Journal of Dairy Science, 93, 5363-5373.
- BÜRKER, K. 1905.
Eine neue Form der Zählkammer.
Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 107, 426-451.
- BURKHARDT, R. 2013.
Hämatologie, Springer-Verlag.

Literaturverzeichnis

- BURTIS, C. A., ASHWOOD, E. R. & BRUNS, D. E. 2012.
Analytical Techniques and Instrumentation.
Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book. Elsevier Health Sciences.
- BURTON, J. L., MADSEN, S. A., CHANG, L. C., WEBER, P. S., BUCKHAM, K. R., VAN DORP, R., HICKEY, M. C. & EARLEY, B. 2005.
Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids: a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows.
Vet Immunol Immunopathol, 105, 197-219.
- BUSCH, W., METHLING, W. & AMSELGRUBER, W. 2003.
Tiergesundheits- und Tierkrankheitslehre, Parey Verlag Stuttgart.
- BUSHINSKY, D. A. 1996.
Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts.
American Journal of Physiology 271, 216-22.
- CAMPBELL, T. W. 2015.
Evaluation of the blood film.
Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice, 18, 117-35.
- CANHAM, A. S. 1930.
Blood of Cattle, Pretoria: Government Printer.
- CANNAS DA SILVA, J., NOORDHUIZEN, J. P., VAGNEUR, M., BEXIGA, R., GELFERT, C. C. & BAUMGARTNER, W. 2006.
Veterinary dairy herd health management in Europe: constraints and perspectives.
Veterinary Quarterly, 28, 23-32.
- CECILIANI, F., CERON, J. J., ECKERSALL, P. D. & SAUERWEIN, H. 2012.
Acute phase proteins in ruminants.
Journal of Proteomics, 75, 4207-4231.
- CHAMBERLAIN, A. C. & TURNER, F. M. 1952.
Errors and Variations in White-Cell Counts.
Biometrics, 8, 55-65.
- 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.
Veterinary Clinical Pathology, 39, 72-78.
- CHASE, C., LUTZ, K., MCKENZIE, E. & TIBARY, A. 2017.
Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Ruminant, John Wiley & Sons.
- CHASSAGNE, M., BARNOUIN, J. & CHACORNAC, J. P. 1999.
Risk factors for stillbirth in holstein heifers under field conditions in france: A prospective survey.
Theriogenology, 51, 1477-1488.
- CONTRERAS, G. A., STRIEDER-BARBOZA, C. & RAPHAEL, W. 2017.
Adipose tissue lipolysis and remodeling during the transition period of dairy cows.
Journal of Animal Science and Biotechnology, 8, 41.

Literaturverzeichnis

- COOK, A. M., MORITZ, A., FREEMAN, K. P. & BAUER, N. 2017.
Objective evaluation of analyzer performance based on a retrospective meta-analysis of instrument validation studies: point-of-care hematology analyzers.
Veterinary Clinical Pathology, 46, 248-261.
- COULTER, W. H. 1953.
Means for counting particles suspended in a fluid.
USA patent application US112819A.
- COULTER, W. H. & HOGO, W. R. 1970.
Signal modulated apparatus for generating and detecting resistive and reactive changes in a modulated current path for particle classification and analysis.
- CRAIGE, A. H., JR. & STOLL, I. V. 1947.
Milk fever (parturient paresis) as a manifestation of alkalosis.
American Journal of Veterinary Research, 8, 168-72.
- DERVISHI, E., ZHANG, G., HAILEMARIAM, D., DUNN, S. M. & AMETAJ, B. N. 2016.
Occurrence of retained placenta is preceded by an inflammatory state and alterations of energy metabolism in transition dairy cows.
Journal of Animal Science and Biotechnology, 7, 26.
- DETILLEUX, J. C., KEHRLI, M. E., STABEL, J. R., FREEMAN, A. E. & KELLEY, D. H. 1995.
Study of immunological dysfunction in periparturient Holstein cattle selected for high and average milk production.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 44, 251-267.
- DIACOVO, T. G., ROTH, S. J., BUCCOLA, J. M., BAINTON, D. F. & SPRINGER, T. A. 1996.
Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18.
Blood, 88, 146-157.
- DIEPGEN, P. 1955.
2. Die Medizin vom Beginn der Zellulärpathologie bis zu den Anfängen der modernen Konstitutionslehre:(etwa 1858-1900); mit einem Ausblick auf die Entwicklung der Heilkunde in den letzten 50 Jahren.
Geschichte der Medizin: die historische Entwicklung der Heilkunde und des ärztlichen Lebens. de Gruyter.
- DIETRICH, C. F., KABAALIOGLU, A., BRUNETTI, E. & RICHTER, J. 2015.
Fasciolosis.
Z Gastroenterol, 53, 285-290.
- DIRKSEN, G. 2012.
Die klinische Untersuchung des Rindes
Berlin, Paul Parey Verlag.
- DIRKSEN, G., GRÜNDER, H. & STÖBER, M. 2006.
Innere Medizin und Chirurgie des Rindes, Parey.
- DITTRICH, W. & GÖHDE, W. 1973.
Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium.
Deutschland patent application DE19681815352 19681218.

Literaturverzeichnis

- DOBBELAAR, P., MOTTRAM, T., NYABADZA, C., HOBBS, P., ELLIOTT-MARTIN, R. J. & SCHUKKEN, Y. H. 1996.
Detection of ketosis in dairy cows by analysis of exhaled breath.
Veterinary Quarterly, 18, 151-152.
- DRACKLEY, J. K. 1999a.
ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?
Journal of Dairy Science, 82, 2259-2273.
- DRACKLEY, J. K. 1999b. Nutritional Management of the Transition Cow. *Dairy Production Conference*. Gainesville.
- DUNKER, C. 2010.
Evaluation der Hämatologiesysteme Sysmex pocH-100iV Diff und XT-2000iV für die Tierart Hund.
Universitätsbibliothek Giessen.
- EARLEY, B., BUCKHAM SPORER, K. & GUPTA, S. 2017.
Invited review: Relationship between cattle transport, immunity and respiratory disease.
Animal, 11, 486-492.
- ECKERSALL, P. D. & BELL, R. 2010.
Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine.
Veterinary Journal, 185, 23-27.
- EDMONSON, A. J., LEAN, I. J., WEAVER, L. D., FARVER, T. & WEBSTER, G. 1989.
A Body Condition Scoring Chart for Holstein Dairy Cows.
Journal of Dairy Science, 72, 68-78.
- EDWARDS, J. L. & TOZER, P. R. 2004.
Using activity and milk yield as predictors of fresh cow disorders.
Journal of Dairy Science, 87, 524-531.
- EHRlich, P. 1880.
Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten.
Zeitschrift für klinische Medizin, 1.
- EL-DEEB, W. M. & EL-BAHR, S. M. 2017.
Biomarkers of ketosis in dairy cows at postparturient period: acute phase proteins and pro-inflammatory cytokines.
Veterinarski Arhiv, 87, 431-440.
- ENGLER, H., BAILEY, M. T., ENGLER, A. & SHERIDAN, J. F. 2004.
Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen.
Journal of Neuroimmunology, 148, 106-115.
- ESTEBAN, E., POLI, M., POIESZ, B., CERIANI, C., DUBE, S., GUTIERREZ, S., DOLCINI, G., GAGLIARDI, R., PEREZ, S. & LÜTZELSCHWAB, C. 2009.
Bovine leukemia virus (BLV), proposed control and eradication programs by marker assisted breeding of genetically resistant cattle.
Animal genetics, 107-130.

Literaturverzeichnis

- FARKHONDEH, T., BOSKABADY, M. H., KOHI, M. K., SADEGHI-HASHJIN, G. & MOIN, M. 2014.
Lead exposure affects inflammatory mediators, total and differential white blood cells in sensitized guinea pigs during and after sensitization.
Drug and Chemical Toxicology, 37, 329-335.
- FEIJO, J. O., PEREIRA, R. A., MONTAGNER, P., DEL PINO, F. A. B., SCHMITT, E. & CORREA, M. N. 2018.
Dynamics of acute phase proteins in dairy cows with subclinical hypocalcemia.
Canadian Journal of Animal Science, 98, 1-8.
- FERGUSON, L. C., IRWIN, M. R. & BEACH, B. A. 1945.
On Variation in the Blood Cells of Healthy Cattle.
The Journal of Infectious Diseases, 76, 24-30.
- FLEISCHER, P., METZNER, M., BEYERBACH, M., HOEDEMAKER, M. & KLEE, W. 2001.
The relationship between milk yield and the incidence of some diseases in dairy cows.
Journal of Dairy Science, 84, 2025-2035.
- FÖLSCHÉ, C. 2012.
Milchleistung als ein Faktor der Tiergesundheit und Fruchtbarkeit.
Diss, Freie Univ. Berlin.
- FOSTER, J. R. 2001.
The functions of cytokines and their uses in toxicology.
International Journal of Experimental Pathology, 82, 171-192.
- FOURICHON, C., SEEGER, H. & MALHER, X. 2000.
Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis.
Theriogenology, 53, 1729-1759.
- FRASER, A. C. 1929.
A study of the blood of cattle and sheep in health and disease.
University of Cambridge, Institute of Animal Pathology, 1st Report, 1931, 114-204 pp.
- FRIE, M. C. & COUSSENS, P. M. 2015.
Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 163, 103-114.
- FRIEDRICH, K. R., HARR, K. E., FREEMAN, K. P., SZLADOVITS, B., WALTON, R. M., BARNHART, K. F. & BLANCO-CHAVEZ, J. 2012.
ASVCP reference interval guidelines: determination of de novo reference intervals in veterinary species and other related topics.
Veterinary Clinical Pathology, 41, 441-453.
- FUENTES-ARDERIU, X., GARCÍA-PANYELLA, M. & DOT-BACH, D. 2007.
Between-examiner reproducibility in manual differential leukocyte counting.
Accreditation and Quality Assurance, 12, 643-645.
- FUJISAWA, S., KONNAI, S., OKAGAWA, T., MAEKAWA, N., TANAKA, A., SUZUKI, Y., MURATA, S. & OHASHI, K. 2019.
Effects of bovine tumor necrosis factor alpha decoy receptors on cell death and inflammatory cytokine kinetics: potential for bovine inflammation therapy.
BMC Veterinary Research, 15, 68.

Literaturverzeichnis

FULWYLER, M. J. 1965.

Electronic separation of biological cells by volume.
Science, 150, 910-911.

FÜRLI 1989.

Vorkommen, Ätiologie, Pathogenese, Diagnostik und medikamentelle Beeinflussung von
Leberschäden beim Rind.

FÜRLI, M. 2016.

Development and basics of metabolic monitoring in dairy cows. Focus on research in Eastern
Germany and at the University of Leipzig, Germany.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G Großtiere / Nutztiere, 44, 107-117.

GALLO, L., CARNIER, P., CASSANDRO, M., MANTOVANI, R., BAILONI, L., CONTIERO, B. &
BITTANTE, G. 1996.

Change in Body Condition Score of Holstein Cows as Affected by Parity and Mature Equivalent Milk
Yield.
Journal of Dairy Science, 79, 1009-1015.

GALVÃO, K. N., FLAMINIO, M. J. B. F., BRITTON, S. B., SPER, R., FRAGA, M., CAIXETA, L.,
RICCI, A., GUARD, C. L., BUTLER, W. R. & GILBERT, R. O. 2010.

Association between uterine disease and indicators of neutrophil and systemic energy status in
lactating Holstein cows.
Journal of Dairy Science, 93, 2926-2937.

GAO, R., YANG, H., JING, S., LIU, B., WEI, M., HE, P. & ZHANG, N. 2018.

Protective effect of chlorogenic acid on lipopolysaccharide-induced inflammatory response in dairy
mammary epithelial cells.
Microbial Pathogenesis, 124, 178-182.

GASTEINER, J. 2000. Ketose, die bedeutendste Stoffwechselerkrankung der Milchkuh. 27.
Viehwirtschaftliche Fachtagung.

GEARHART, M. A., CURTIS, C. R., ERB, H. N., SMITH, R. D., SNIFFEN, C. J., CHASE, L. E. &
COOPER, M. D. 1990.

Relationship of Changes in Condition Score to Cow Health in Holsteins.
Journal of Dairy Science, 73, 3132-3140.

GEKLE, M. 2010.

Physiologie, Georg Thieme Verlag.

GENTRY, P. A., ROSS, M. L. & CHAN, P. K. 1984.

Effect of T-2 toxin on bovine hematological and serum enzyme parameters.
Veterinary and human toxicology, 26, 24-28.

GEORGE, J. W., SNIPES, J. & LANE, V. M. 2010.

Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006.
Veterinary Clinical Pathology, 39, 138-148.

GERARDI, A. S. 1996.

Bovine leucocyte adhesion deficiency: a review of a modern disease and its implications.
Research in Veterinary Science, 61, 183-186.

Literaturverzeichnis

- GIORDANO, A., ROSSI, G., PIERALISI, C. & PALTRINIERI, S. 2008.
Evaluation of equine hemograms using the ADVIA 120 as compared with an impedance counter and manual differential count.
Veterinary Clinical Pathology, 37, 21-30.
- GOFF, J. & HORST, R. 2001.
Oral glycerol as an aid in the treatment of ketosis/fatty liver complex.
Journal of Dairy Science, 84.
- GOFF, J. P. & HORST, R. L. 1997a.
Effects of the Addition of Potassium or Sodium, but Not Calcium, to Parturition Rations on Milk Fever in Dairy Cows¹.
Journal of Dairy Science, 80, 176-186.
- GOFF, J. P. & HORST, R. L. 1997b.
Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders.
Journal of Dairy Science, 80, 1260-1268.
- GOLDMANN, F., BAUER, N. & MORITZ, A. 2013.
Comparison of the ProCyt Dx analyzer with the ADVIA 2120 and the manual differential for validation of equine and bovine hemograms.
Comparative Clinical Pathology, 22, 855-868.
- GÖTZE, K. 2017.
Untersuchungen zur Aussagekraft der Pansenfüllungsbenotung als antepartaler Indikator für die Gesundheit, Fruchtbarkeit und Milchleistung in der Folgelaktation bei Holstein-Friesian Kühen. Freie Universität Berlin.
- GREEN, R. & WACHSMANN-HOGIU, S. 2015.
Development, History, and Future of Automated Cell Counters.
Clinics in Laboratory Medicine, 35, 1-10.
- GROHN, Y., LINDBERG, L. A., BRUSS, M. L. & FARVER, T. B. 1983.
Fatty infiltration of liver in spontaneously ketotic dairy cows.
Journal of Dairy Science, 66, 2320-2328.
- GRUYS, E., TOUSSAINT, M. J. M., NIEWOLD, T. A. & KOOPMANS, S. J. 2005.
Acute phase reaction and acute phase proteins.
Journal of Zhejiang University. Science. B, 6, 1045-1056.
- GUIDRY, A. J., PAAPE, M. J. & PEARSON, R. E. 1976.
Effects of parturition and lactation on blood and milk cell concentrations, corticosteroids, and neutrophil phagocytosis in the cow.
American journal of veterinary research, 37, 1195-1200.
- GULATI, G., SONG, J., DULAU FLOREA, A. & GONG, J. 2013.
Purpose and Criteria for Blood Smear Scan, Blood Smear Examination, and Blood Smear Review.
Annals of Laboratory Medicine, 33, 1-7.
- GULATI, G. L., HYLAND, L. J., KOCHER, W. & SCHWARTING, R. 2002.
Changes in automated complete blood cell count and differential leukocyte count results induced by storage of blood at room temperature.
Archives of Pathology and Laboratory Medicine, 126, 336-342.

Literaturverzeichnis

- GUNNINK, J. W. 1984.
Retained placenta and leucocytic activity.
Veterinary Quarterly, 6, 49-51.
- HAFERLACH, T. 2012.
Taschenatlas Hämatologie: Mikroskopische und klinische Diagnostik für die Praxis, Georg Thieme Verlag.
- HAJDU, S. I. 2003.
The discovery of blood cells.
Annals of Clinical & Laboratory Science, 33, 237-238.
- HAMMON, D. S., EVJEN, I. M., DHIMAN, T. R., GOFF, J. P. & WALTERS, J. L. 2006.
Neutrophil function and energy status in Holstein cows with uterine health disorders.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 113, 21-29.
- HARVEY, J. W. 2012.
Chapter 2 - Hematology Procedures.
In: HARVEY, J. W. (ed.) Veterinary Hematology. Saint Louis: W.B. Saunders.
- HARVEY, J. W. 2017.
The feline blood film: 1. Techniques and erythrocyte morphology.
Journal of Feline Medicine and Surgery, 19, 529-540.
- HELLEBREKERS, P., VRISEKOOOP, N. & KOENDERMAN, L. 2018.
Neutrophil phenotypes in health and disease.
European Journal of Clinical Investigation, 48 Suppl 2, e12943.
- HERDT, T. H. 2000.
Ruminant adaptation to negative energy balance. Influences on the etiology of ketosis and fatty liver.
Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 16, 215-230.
- HERMAN, N., TRUMEL, C., GEFFRÉ, A., BRAUN, J.-P., THIBAUT, M., SCHELCHER, F. & BOURGÈS-ABELLA, N. 2018.
Hematology reference intervals for adult cows in France using the Sysmex XT-2000iV analyzer.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 30, 678-687.
- HEWSON, W. 1768.
An account of the lymphatic system in birds; by Mr. William Hewson, Reader in Anatomy: In a letter to William Hunter, M.D. F. R. S. and by him communicated to the Society.
Philosophical Transactions of the Royal Society of London, 58, 217-226.
- HISAEDA, K., HAGIWARA, K., EGUCHI, J., YAMANAKA, H., KIRISAWA, R. & IWAI, H. 2001.
Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha levels in sera and whey of cattle with naturally occurring coliform mastitis.
Journal of Veterinary Medical Science, 63, 1009-1011.
- HOEBEN, D., BURVENICH, C., MASSART-LEËN, A.-M., LENJOU, M., NIJS, G., VAN BOCKSTAELE, D. & BECKERS, J.-F. 1999.
In vitro effect of ketone bodies, glucocorticosteroids and bovine pregnancy-associated glycoprotein on cultures of bone marrow progenitor cells of cows and calves.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 68, 229-240.
- HOFF, F. 1928.
Blut und vegetative Regulation.
Ergebnisse der Inneren Medizin und Kinderheilkunde. Springer.

Literaturverzeichnis

- HOGAN, J. S., WEISS, W. P. & SMITH, K. L. 1993.
Role of Vitamin E and Selenium in Host Defense Against Mastitis1.
Journal of Dairy Science, 76, 2795-2803.
- HOLMAN, H. H. 1956.
Changes associated with age in the blood picture of calves and heifers.
British Veterinary Journal, 112, 91-104.
- HOLMES, D., PETTIGREW, D., RECCIUS, C. H., GWYER, J. D., VAN BERKEL, C.,
HOLLOWAY, J., DAVIES, D. E. & MORGAN, H. 2009.
Leukocyte analysis and differentiation using high speed microfluidic single cell impedance cytometry.
Lab on a Chip, 9, 2881-2889.
- HORST, R., GOFF, J. & REINHARDT, T. 2003.
Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis.
Acta Veterinaria Scandinavica Supplementum, 97, 35-50.
- HOUWEN, B. 2001.
The differential cell count.
Laboratory Hematology, 7, 89-100.
- HOUWEN, B. 2002.
Blood film preparation and staining procedures.
Clinics in Laboratory Medicine, 22, 1-14.
- HUSSAIN, A. M. & DANIEL, R. C. W. 1992.
Phagocytosis by uterine fluid and blood neutrophils and hematological changes in postpartum cows
following normal and abnormal parturition.
Theriogenology, 37, 1253-1267.
- INGVARTSEN, K. L. 2006.
Feeding- and management-related diseases in the transition cow: Physiological adaptations around
calving and strategies to reduce feeding-related diseases.
Animal Feed Science and Technology, 126, 175-213.
- INGVARTSEN, K. L. & MOYES, K. 2012.
Nutrition, immune function and health of dairy cattle.
animal, 7, 112-122.
- INGVARTSEN, K. L. & MOYES, K. M. 2015.
Factors contributing to immunosuppression in the dairy cow during the periparturient period.
Japanese Journal of Veterinary Research, 63 Suppl 1, 15-24.
- INTERNATIONAL COUNCIL FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY, W. G.,
BRIGGS, C., CULP, N., DAVIS, B., D'ONOFRIO, G., ZINI, G., MACHIN, S. J. &
HAEMATOLOGY, T. I. C. F. S. O. 2014.
ICSH guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential
leucocyte and reticulocyte counting.
International Journal of Laboratory Hematology, 36, 613-627.

Literaturverzeichnis

INTERNATIONAL COUNCIL FOR STANDARDIZATION IN HAEMATOLOGY, W. G., ENGLAND, J. M., ROWAN, R. M., VAN ASSENDELFT, O. W., COULTER, W. H., GRONER, W., JONES, A. R., KOEPKE, J. A., LEWIS, S. M., SHINTON, N. K. & THOM, R. 1984.

Protocol for evaluation of automated blood cell counters.
Clinical & Laboratory Haematology, 6, 69-84.

ISLAM, R., KUMAR, H. & KRISHNAN, B. B. 2014.
Investigation on leukocyte profile of periparturient cows with or without postpartum reproductive disease.
Asian Pacific Journal of Reproduction, 3, 57-63.

JAIN, N. C. 1976.
Neutrophil leukocytes and inflammation of the bovine mammary gland.
Theriogenology, 6, 153-173.

JASTER, K. 2004.
Zum Einfluss der Milchleistung auf die Wirtschaftlichkeit der Milcherzeugung.
Züchtungskunde, 76, 449-456.

JENSEN, A. L. & KJELGAARD-HANSEN, M. 2010.
Diagnostic test validation.
Schalm's Veterinary Hematology. Wiley-Blackwell.

JONES, H. R., ROBB, C. T., PERRETTI, M. & ROSSI, A. G. 2016.
The role of neutrophils in inflammation resolution.
Seminars in Immunology, 28, 137-145.

JONES, M. L. & ALLISON, R. W. 2007.
Evaluation of the Ruminant Complete Blood Cell Count.
Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 23, 377-402.

JUDSON, L. V. 1925.
new ruling for hemacytometer chambers.
Journal of the American Medical Association, 84, 947-947.

KANITZ, W., BECKER, F., DIETL, G., REINSCH, N. & STAUFENBIEL, R. 2003.
Beziehungen zwischen Milchleistung, Energieversorgung und Fruchtbarkeit unter den Bedingungen von Hochleistung beim Rind.
Züchtungskunde, 75, 489-498.

KEHRLI, M. E., NONNECKE, B. J. & ROTH, J. A. 1989.
Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period.
American journal of veterinary research, 50, 207.

KILGORE, E. S. 1920.
Relation of quantitative methods to the advance of medical science.
The Journal of the American Medical Association, 88.

KIM, I.-H., NA, K.-J. & YANG, M.-P. 2005a.
Immune Responses during the Peripartum Period in Dairy Cows with Postpartum Endometritis.
Journal of Reproduction and Development, advpub, 0510050026-0510050026.

KIM, I.-H., NA, K.-J. & YANG, M.-P. 2005b.
Immune responses during the peripartum period in dairy cows with postpartum endometritis.
Journal of Reproduction and Development, 0510050026-0510050026.

Literaturverzeichnis

- KIMURA, K., GOFF, J. P., KEHRLI, M. E. & REINHARDT, T. A. 2002.
Decreased Neutrophil Function as a Cause of Retained Placenta in Dairy Cattle.
Journal of Dairy Science, 85, 544-550.
- KIRBACH, H., JÜNGER, C., KLEISER, L. & FÜRLI, M. 1998.
Schnelldiagnostika in der Nutztierpraxis.
Stoffwechselbelastung,-diagnostik und-stabilisierung beim Rind. Akademie für Tierärztliche
Fortbildung, Leipzig, 243-248.
- KJELGAARD-HANSEN, M. & JENSEN, A. L. 2006.
Is the inherent imprecision of manual leukocyte differential counts acceptable for quantitative
purposes?
Veterinary Clinical Pathology, 35, 268-270.
- KLEIN, W., KÜHN, I. & BROICHER, C. 1940.
Studien über das Blutbild warmblütiger Tiere, gerichtet auf die Konstitution: IV. Das Blutbild des
Schweines 1.
Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie, 46, 203-236.
- KLINKON, M. & ZADNIK, T. 1999.
Dynamics of red and white blood picture in dairy cows during the periparturient period.
Comparative Haematology International, 9, 156-161.
- KOEPKE, J., VAN ASSENDELFT, O., BRINDZA, L., DAVIS, B., FERNANDES, B., GEWIRTZ,
A. & RABINOVITCH, A. 2007.
Reference leukocyte (WBC) differential count (proportional) and evaluation of instrumental methods;
approved standard.
Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Document H2O-A2.
- KOEPKE, J. A., DOTSON, M. A. & SHIFMAN, M. A. 1985.
A critical evaluation of the manual/visual differential leukocyte counting method.
Blood Cells, 11, 173-86.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013.
Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.
Nature Reviews Immunology, 13, 159.
- KRAFT, W. & DÜRR, U. M. 1997.
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Schattauer Verlag.
- KRAFT, W. & DÜRR, U. M. 2013.
Hämatologie.
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. Schattauer Verlag.
- KRAMER, J. 2000.
Normal hematology of cattle, sheep and goats.
Schalm's veterinary hematology, 5, 1075-1084.
- KRAUSE, A. R. T., PFEIFER, L. F. M., MONTAGNER, P., WESCHENFELDER, M. M.,
SCHWEGLER, E., LIMA, M. E., XAVIER, E. G., BRAUNER, C. C., SCHMITT, E., DEL
PINO, F. A. B., MARTINS, C. F., CORRÊA, M. N. & SCHNEIDER, A. 2014.
Associations between resumption of postpartum ovarian activity, uterine health and concentrations of
metabolites and acute phase proteins during the transition period in Holstein cows.
Animal Reproduction Science, 145, 8-14.

Literaturverzeichnis

- KREUZER, K.-A. & BAIN, B. 2017.
Das Blutbild: Diagnostische Methoden und klinische Interpretation. Walter de Gruyter GmbH & Co KG.
- KROSCHINSKY, F., SCHÄKEL, U. & EHNINGER, G. 2007.
Leukozytose.
Der Internist, 48, 1239-1254.
- KUJALA, M., ORRO, T. & SOVERI, T. 2010.
Serum acute phase proteins as a marker of inflammation in dairy cattle with hoof diseases.
Veterinary Record, 166, 240.
- KULBERG, S., STORSET, A. K., HERINGSTAD, B. & LARSEN, H. J. S. 2002.
Reduced Levels of Total Leukocytes and Neutrophils in Norwegian Cattle Selected for Decreased Mastitis Incidence.
Journal of Dairy Science, 85, 3470-3475.
- KUMAR, B. V. & MOHAN, T. 2018.
Sigma metrics as a tool for evaluating the performance of internal quality control in a clinical chemistry laboratory.
Journal of laboratory physicians, 10, 194-199.
- LANDWIRTSCHAFT, B. F. E. U. September 2016. Milchwirtschaft auf einen Blick. Milchindustrie-Verband e.V.
- LEBIEN, T. W. & TEDDER, T. F. 2008.
B lymphocytes: how they develop and function.
Blood, 112, 1570-1580.
- LEBLANC, S. 2010.
Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period.
Journal of Reproduction and Development, 56 Suppl, S29-35.
- LEE, E. & KEHRLI, M. 1998.
Expression of adhesion molecules on neutrophils of periparturient cows and neonatal calves.
American journal of veterinary research, 59, 37-43.
- LILLIEHÖÖK, I. & TVEDTEN, H. 2009.
Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts.
Veterinary Clinical Pathology, 38, 175-182.
- LOPPNOW, H. 2001.
Zytokine: Klassifikation, Rezeptoren, Wirkungsmechanismen.
Der Internist, 42, 13-27.
- LUMSDEN, J. H., MULLEN, K. & ROWE, R. 1980.
Hematology and biochemistry reference values for female Holstein cattle.
Canadian journal of comparative medicine : Revue canadienne de medecine comparee, 44, 24-31.
- LUNDQUIST, N. S., ZEHNER, C. E. & PHILLIPS, P. H. 1949.
The Effect of Vaccination with Brucella Abortus Vaccine (Strain 19) on Certain Blood Constituents in Young Heifers.
Journal of Dairy Science, 32, 914-918.

Literaturverzeichnis

- LYON, J. F. & THOMA, R. 1881.
Ueber die Methode der Blutkörperzählung.
Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin, 84, 131-154.
- MACLACHLAN, N. J. & THOMPSON, J. 1985.
Bluetongue virus-induced interferon in cattle.
American journal of veterinary research, 46, 1238-1241.
- MAGATA, F., KITAOKA, R., MORINO, I., TERAMURA, M., KAWASHIMA, C., HANEDA, S. & SHIMIZU, T. 2016.
Long-term impact of puerperal metritis on the profiles of peripheral blood leukocytes in peripartum dairy cows.
Animal Science Journal, 87, 151-155.
- MAHLBERG, R., GILLES, A. & LÄSCH, A. 2014a.
Hämatologie: Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe, John Wiley & Sons.
- MAHLBERG, R., GILLES, A. & LÄSCH, A. 2014b.
Leukozyten - Zählung.
Hämatologie: Theorie und Praxis für medizinische Assistenzberufe. John Wiley & Sons.
- MARTINEZ, N., RISCO, C. A., LIMA, F. S., BISINOTTO, R. S., GRECO, L. F., RIBEIRO, E. S., MAUNSELL, F., GALVÃO, K. & SANTOS, J. E. P. 2012.
Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease.
Journal of Dairy Science, 95, 7158-7172.
- MCART, J. A., NYDAM, D. V. & OETZEL, G. R. 2012.
Epidemiology of subclinical ketosis in early lactation dairy cattle.
Journal of Dairy Science, 95, 5056-5066.
- MCCARTHY, D. A. & DALE, M. M. 1988.
The Leucocytosis of Exercise.
Sports Medicine, 6, 333-363.
- MCDUGALL, S., LEBLANC, S. J. & HEISER, A. 2017.
Effect of prepartum energy balance on neutrophil function following pegbovigrastim treatment in periparturient cows.
Journal of Dairy Science, 100, 7478-7492.
- MCPHERSON, R. & PINCUS, M. R. 2017.
Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods.
- MCSHERRY, B. J., MAPLESDEN, D. C. & BRANION, H. D. 1960.
Ketosis in Cattle—a Review.
The Canadian Veterinary Journal, 1, 208-213.
- MEGLIA, G. E., JOHANNISSON, A., AGENÄS, S., HOLTENIUS, K. & WALLER, K. P. 2005.
Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in periparturient dairy cows.
The Veterinary Journal, 169, 376-384.
- MEHRZAD, J., DOSOGNE, H., MEYER, E., HEYNEMAN, R. & BURVENICH, C. 2001.
Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation.
Journal of Dairy Research, 68, 399-415.

Literaturverzeichnis

- MEINKOTH, J. H. & ALLISON, R. W. 2007.
Sample Collection and Handling: Getting Accurate Results.
Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 37, 203-219.
- MERRILL, W. G. & SMITH, V. R. 1954.
A Comparison of Some Cellular and Chemical Constituents of Blood at Time of Parturition and after Administration of Adrenocorticotrophin I.
Journal of Dairy Science, 37, 546-551.
- METZNER, M., HEUWIESER, W. & KLEE, W. 1993.
Die Beurteilung der Körperkondition (body condition scoring) im Herdenmanagement.
Der praktische Tierarzt, 74.
- MIRZADEH, K., TABATABAEI, S., BOJARPOUR, M. & MAMOEI, M. 2010.
Comparative study of hematological parameters according strain, age, sex, physiological status and season in Iranian cattle.
Journal of Animal Veterinary advances, 9, 2123-2127.
- MOBERG, R. 1955.
The white blood picture in sexually mature female cattle with special reference to sexual conditions : a clinical and experimental study. Almquist & Wiksells Boktryckeri AB.
- MOENNIG, V. & GREISER-WILKE, I. 2003.
Perspectives on BVD eradication in Germany.
Berliner und Munchener tierarztliche Wochenschrift, 116, 222-226.
- MOENNIG, V., HOUE, H. & LINDBERG, A. 2005.
BVD control in Europe: current status and perspectives.
Animal Health Research Reviews, 6, 63-74.
- MOHRI, M., SHARIFI, K. & EIDI, S. 2007.
Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related changes and comparison with blood composition in adults.
Research in Veterinary Science, 83, 30-39.
- MONKE, D. R., KOCIBA, G. J., DEJARNETTE, M., ANDERSON, D. E. & AYARS, W. H. 1998.
Reference values for selected hematologic and biochemical variables in Holstein bulls of various ages.
American journal of veterinary research, 59, 1386-1391.
- MORETTI, P., PROBO, M., CANTONI, A., PALTRINIERI, S. & GIORDANO, A. 2016.
Fluctuation of neutrophil counts around parturition in Holstein dairy cows with and without retained placenta.
Research in Veterinary Science, 107, 207-212.
- MORETTI, P., PROBO, M., MORANDI, N., TREVISI, E., FERRARI, A., MINUTI, A., VENTURINI, M., PALTRINIERI, S. & GIORDANO, A. 2015.
Early post-partum hematological changes in Holstein dairy cows with retained placenta.
Animal Reproduction Science, 152, 17-25.
- MORITZ, A. 2002.
Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin. Büchse der Pandora Verlags-GmbH.

Literaturverzeichnis

- MORITZ, A. 2014. Hämatologie. In: MORITZ, A. (ed.) *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*. 7., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage ed. Stuttgart: Schattauer GmbH.
- MORITZ, A., KRAFT, W. & DÜRR, U. M. 2013a.
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Schattauer Verlag.
- MORITZ, A., KRAFT, W., DÜRR, U. M. & HARTMANN, K. 2013b.
Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin, Schattauer.
- MORROW, D. A. 1976.
Fat cow syndrome.
Journal of Dairy Science, 59, 1625-1629.
- NAEGELI, O. 1923.
Blutkrankheiten und Blutdiagnostik Lehrbuch der Klinischen Hämatologie, Springer-Verlag.
- NAGAHATA, H. 2004.
Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review.
Journal of Veterinary Medical Science, 66, 1475-1482.
- NAZIFI, S., AHMADI, M. R. & GHEISARI, H. R. 2008.
Hematological changes of dairy cows in postpartum period and early pregnancy.
Comparative Clinical Pathology, 17, 157-163.
- NAZLIBILEK, S., KARACOR, D., ERCAN, T., SAZLI, M. H., KALENDER, O. & EGE, Y. 2014.
Automatic segmentation, counting, size determination and classification of white blood cells.
Measurement, 55, 58-65.
- NETH, R. D. 1979.
Zusammenfassung praxisgerechter Untersuchungen.
In: NETH, R. D. (ed.) *Blutbild und Urinstatus*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- NEVALAINEN, D., BERTE, L., KRAFT, C., LEIGH, E., PICASO, L. & MORGAN, T. 2000.
Evaluating Laboratory Performance on Quality Indicators With the Six Sigma Scale.
Archives of Pathology & Laboratory Medicine, 124, 516-519.
- NEWSHOLME, P., GORDON, S. & NEWSHOLME, E. A. 1987.
Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages.
Biochemical Journal, 242, 631-636.
- NIEMEYER, C., ORTMANN, C. & BAUMANN, I. 2006.
Morphologische hämatologische Diagnostik.
In: GADNER, H., GAEDICKE, G., NIEMEYER, C. & RITTER, J. (eds.) *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- O'DRISCOLL, K., MCCABE, M. & EARLEY, B. 2015.
Differences in leukocyte profile, gene expression, and metabolite status of dairy cows with or without sole ulcers.
Journal of Dairy Science, 98, 1685-1695.
- OETZEL, G. R. & MILLER, B. E. 2012.
Effect of oral calcium bolus supplementation on early-lactation health and milk yield in commercial dairy herds.
Journal of Dairy Science, 95, 7051-7065.

Literaturverzeichnis

- OGAWA, H., TU, C. H., KAGAMIZONO, H., SOKI, K., INOUE, Y., AKATSUKA, H., NAGATA, S., WADA, T., IKEYA, M., MAKIMURA, S., UCHIDA, K., YAMAGUCHI, R. & OTSUKA, H. 1997.
Clinical, morphologic, and biochemical characteristics of Chediak-Higashi syndrome in fifty-six Japanese black cattle.
American Journal of Veterinary Research, 58, 1221-1226.
- OLTENACU, P. A. & BROOM, D. M. 2010.
The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows.
Animal Welfare, 19, 39-49.
- OMMAN, R. A. & KINI, A. R. 2011.
Leukocyte Development, Kinetics, and Functions.
Rodak's Hematology-E-Book: Clinical Principles and Applications, 117.
- OORMAZDI, H. & BAKER, K. P. 1980.
Studies on the Effects of Lice on Cattle.
British Veterinary Journal, 136, 146-153.
- OSBURN, B. I. & GLEN, B. L. 1968.
Acquired Pelger-Huet anomaly in cattle.
Journal of the American Veterinary Medical Association, 152, 11-6.
- OTTER, A. 2013.
Diagnostic blood biochemistry and haematology in cattle.
In Practice, 35, 7-16.
- PAAPE, M. J., BANNERMAN, D. D., ZHAO, X. & LEE, J. W. 2003.
The bovine neutrophil: Structure and function in blood and milk.
Veterinary Research 34, 597-627.
- PALMER, L., BRIGGS, C., MCFADDEN, S., ZINI, G., BURTHEM, J., ROZENBERG, G., PROYTCHIEVA, M. & MACHIN, S. J. 2015.
ICSH recommendations for the standardization of nomenclature and grading of peripheral blood cell morphological features.
International Journal of Laboratory Hematology, 37, 287-303.
- PAPPENHEIM, A. 1911.
Die mikroskopische Untersuchung des Blutes.
Der Harn sowie die übrigen Ausscheidungen und Körperflüssigkeiten. Springer.
- PARKIN, J. & COHEN, B. 2001.
An overview of the immune system.
The Lancet, 357, 1777-1789.
- PATERSON, J. Y. F. 1957.
17-Hydroxycorticosteroids and leucocytes in the blood of dairy cattle.
Journal of Comparative Pathology and Therapeutics, 67, 165-179.
- PATT, H. M. & MALONEY, M. A. 1959.
Patterns of neutrophilic leukocyte development and distribution.
Annals of the New York Academy of Sciences, 77, 766-772.

Literaturverzeichnis

- PEARCE, ERIKA L. & PEARCE, EDWARD J. 2013.
Metabolic Pathways in Immune Cell Activation and Quiescence.
Immunity, 38, 633-643.
- PEDRON, O., CHELI, F., SENATORE, E., BAROLI, D. & RIZZI, R. 1993.
Effect of Body Condition Score at Calving on Performance, Some Blood Parameters, and Milk Fatty Acid Composition in Dairy Cows.
Journal of Dairy Science, 76, 2528-2535.
- PENNY, R. H. C., SCOFIELD, A. M. & CEMBROWICZ, H. 1966.
Haematological Values for the Clinically Normal Bull.
British Veterinary Journal, 122, 239-247.
- PEREZ-ALENZA, M. D., BLANCO, J., SARDON, D., SÁNCHEZ MOREIRO, M. A.,
RODRÍGUEZ-BERTOS, A., SÁNCHEZ, B., PIZARRO, M., MAZZUCHELLI, F. &
PEÑA, L. 2006.
Clinico-pathological findings in cattle exposed to chronic bracken fern toxicity.
New Zealand Veterinary Journal, 54, 185-192.
- PETERSEN, H. H., NIELSEN, J. P. & HEEGAARD, P. M. 2004.
Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry.
Veterinary Research 35, 163-87.
- PETERSEN, P. H., RICOS, C., STOCKL, D., LIBEER, J. C., BAADENHUIJSEN, H., FRASER, C.
& THIENPONT, L. 1996.
Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory.
European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 34, 983-999.
- PETRIE, A. & WATSON, P. 2006.
An introduction to hypothesis testing.
In: PUBLISHING, B. (ed.) Statistics for Veterinary and Animal Science. 2 ed. Oxford.
- PIATON, E., FABRE, M., GOUBIN-VERSINI, I., BRETZ-GRENIER, M.-F., COURTADE-SAÏDI,
M., VINCENT, S., BELLEANNÉE, G., THIVOLET, F., BOUTONNAT, J., DEBAQUE, H.,
FLEURY-FEITH, J., VIELH, P., COCHAND-PRIOU, B., EGELÉ, C., BELLOCOQ, J.-P.
& MICHELS, J.-F. 2015.
Recommandations techniques et règles de bonne pratique pour la coloration de May-Grünwald-
Giemsa : revue de la littérature et apport de l'assurance qualité.
Annales de Pathologie, 35, 294-305.
- PIERRE, R. V. 2002.
Peripheral blood film review: the demise of the eyecount leukocyte differential.
Clinics in Laboratory Medicine, 22, 279-297.
- PIÑEIRO, M., ANDRÉS, M., ITURRALDE, M., CARMONA, S., HIRVONEN, J., PYÖRÄLÄ, S.,
HEEGAARD, P. M. H., TJØRNEHØJ, K., LAMPREAVE, F., PIÑEIRO, A. & ALAVA, M.
A. 2004.
ITI4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle
during experimental infection.
Infection and immunity, 72, 3777-3782.
- RAZZAGHI, A., ALIARABI, H., TABATABAEI, M. M., SAKI, A. A., VALIZADEH, R. &
ZAMANI, P. 2012.
Effect of Dietary Cation-Anion Difference during Prepartum and Postpartum Periods on Performance,
Blood and Urine Minerals Status of Holstein Dairy Cow.
Asian-Australasian journal of animal sciences, 25, 486-495.

Literaturverzeichnis

- REBAR, A. H. 2015.
Chapter 196 - Blood Film Evaluation.
In: SILVERSTEIN, D. C. & HOPPER, K. (eds.) Small Animal Critical Care Medicine (Second Edition). St. Louis: W.B. Saunders.
- REID, I. M., DEW, A. M. & WILLIAMS, L. A. 1984.
Haematology of subclinical fatty liver in dairy cows.
Research in Veterinary Science, 37, 63-65.
- REID, I. M., ROWLANDS, G. J., DEW, A. M., COLLINS, R. A., ROBERTS, C. J. & MANSTON, R. 2009.
The relationship between post-parturient fatty liver and blood composition in dairy cows.
The Journal of Agricultural Science, 101, 473-480.
- ROCHE, J. R., FRIGGENS, N. C., KAY, J. K., FISHER, M. W., STAFFORD, K. J. & BERRY, D. P. 2009.
Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare.
Journal of Dairy Science, 92, 5769-5801.
- RODRÍGUEZ BARRERO, C. M., ROMERO GABALAN, L. A. & ROA GUERRERO, E. E. 2018.
A Novel Approach for Objective Assessment of White Blood Cells Using Computational Vision Algorithms.
Advances in Hematology, 2018, 4716370.
- ROLAND, L., DRILLICH, M., FIDLSCHUSTER, B., SCHWENDENWEIN, I. & IWERSEN, M. 2014a.
Short communication: evaluation of an automated in-house hematology analyzer for bovine blood.
Journal of Dairy Science, 97, 5580-5586.
- ROLAND, L., DRILLICH, M. & IWERSEN, M. 2014b.
Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine.
Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 26, 592-598.
- ROLEFF, S. 2006.
Klinische Evaluierung des automatischen Blutzellzählgerätes CA530-VET durch Vergleich mit dem CELL-DYN 3500 und Standardmethoden für die Tierarten Hund, Katze und Pferd. FU Berlin.
- ROMANOWSKY, D. 1891.
Zur Frage der Parasitologie und Therapie der Malaria.
St Petersburg Medizinische Wochenschrift, 16, 307-315.
- ROTH, J. A., KAEBERLE, M. L. & GRIFFITH, R. W. 1981.
Effects of bovine viral diarrhoea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function.
American Journal of Veterinary Research, 42, 244-250.
- RUEGG, P. L., GOODGER, W. J., HOLMBERG, C. A., WEAVER, L. D. & HUFFMAN, E. M. 1992.
Relation among body condition score, serum urea nitrogen and cholesterol concentrations, and reproductive performance in high-producing Holstein dairy cows in early lactation.
American Journal of Veterinary Research, 53, 10-14.

Literaturverzeichnis

- RUIZ, R., TEDESCHI, L. O. & SEPULVEDA, A. 2017.
Investigation of the effect of pegbovigrastim on some periparturient immune disorders and performance in Mexican dairy herds.
Journal of Dairy Science, 100, 3305-3317.
- RUKKWAMSUK, T., KRUIP, T. A. & WENSING, T. 1999.
Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period.
Veterinary Quarterly, 21, 71-77.
- RÜMKE, C. L. 1985.
Imprecision of ratio-derived differential leukocyte counts.
Blood Cells, 11, 311-315.
- RÜMKE, C. L., BEZEMER, P. D. & KUIK, D. J. 1975.
Normal values and least significant differences for differential leukocyte counts.
Journal of Chronic Diseases, 28, 661-668.
- RUSOFF, L. L. & PIERCY, P. L. 1946.
Blood Studies of Louisiana Dairy Cows. II. Calcium, Inorganic Phosphorus, Hemoglobin Value, Erythrocyte Count, Leucocyte Count and Differential Leucocyte Percentages.
Journal of Dairy Science, 29, 831-838.
- RYAN, G. M. 1971.
Blood Values in Cows: Leucocytes.
Research in Veterinary Science, 12, 576-578.
- SAAD, A. M., CONCHA, C. & ÅSTRÖM, G. 1989.
Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition.
Journal of Veterinary Medicine, Series B, 36, 337-345.
- SAAD, A. M. & OSTENSSON, K. 1990.
Flow cytometric studies on the alteration of leukocyte populations in blood and milk during endotoxin-induced mastitis in cows.
American journal of veterinary research, 51, 1603-1607.
- SCALIA, D., LACETERA, N., BERNABUCCI, U., DEMEYERE, K., DUCHATEAU, L. & BURVENICH, C. 2006.
In vitro effects of nonesterified fatty acids on bovine neutrophils oxidative burst and viability.
Journal of Dairy Science, 89, 147-154.
- SCARBOROUGH, R. A. 1931.
The Blood Picture of Normal Laboratory Animals.
The Yale journal of biology and medicine, 4, 69-82.
- SCHALM, O. W., JAIN, N. C. & CARROLL, E. J. 1975.
Veterinary hematology
Philadelphia, Lea & Febiger.
- SCHILLING, V. 1920.
Über die Notwendigkeit grundsätzlicher Beobachtung die neutrophilen Kernverschiebung in Leucocytenbild und über praktische Erfolge dieser Methode.
Zeitschrift für klinische Medizin, 89.

Literaturverzeichnis

- SCHILLING, V. 1924.
Biologische Leukozytenkurven als klinisches Hilfsmittel.
DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 50, 1583-1584.
- SCHILLING, V. 1926.
Absolute oder relative Zahlen bei der Verwertung des weißen Blutbildes?
DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift, 52, 1034-1036.
- SCHILLING, V. 1956.
Die Regulierung des morphologischen Blutbildes.
In: BEGEMANN, H. (ed.) *Fünfter Kongress der Europäischen Gesellschaft für Hämatologie: Colloquium über Aktuelle Probleme des Transfusionswesens und der Immun-Hämatologie.*
Berlin, Heidelberg: Springer
- SCHIRRMEIER, H. Year.
Published. Three years of mandatory BVD control in Germany—lessons to be learned.
Proceedings of the XXVIII World Buiatrics Congress. Cairns, 2014. Cairns, Australia, 245-248.
- SCHMID-SCHONBEIN, G. W., SEIFFGE, D., DELANO, F. A., SHEN, K. & ZWEIFACH, B. W. 1991.
Leukocyte Counts and Activation in Spontaneously Hypertensive and Normotensive Rats.
Hypertension, 17.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W., SEIFFGE, D., DELANO, F. A., SHEN, K. & ZWEIFACH, B. W. 1991.
Leukocyte counts and activation in spontaneously hypertensive and normotensive rats.
Hypertension, 17.
- SCHNEIDER, A., CORRÊA, M. N. & BUTLER, W. R. 2013.
Short communication: Acute phase proteins in Holstein cows diagnosed with uterine infection.
Research in Veterinary Science, 95, 269-271.
- SCHULZ, K., FRAHM, J., KERSTEN, S., MEYER, U., REICHE, D., SAUERWEIN, H. & DANICKE, S. 2015.
Effects of elevated parameters of subclinical ketosis on the immune system of dairy cows: in vivo and in vitro results.
Archives of Animal Nutrition, 69, 113-127.
- SCHULZ, K., FRAHM, J., MEYER, U., KERSTEN, S., REICHE, D., REHAGE, J. & DANICKE, S. 2014.
Effects of prepartal body condition score and peripartal energy supply of dairy cows on postpartal lipolysis, energy balance and ketogenesis: an animal model to investigate subclinical ketosis.
Journal of Dairy Research, 81, 257-266.
- SCHWARTZ, I. & LEVY, D. 1994.
Pathobiology of bovine leukemia virus.
Veterinary research, 25, 521-536.
- SHEARER, J. K., VAN AMSTEL, S. R. & BRODERSEN, B. W. 2012.
Clinical Diagnosis of Foot and Leg Lameness in Cattle.
Veterinary Clinics: Food Animal Practice, 28, 535-556.
- SHELDON, I. M., LEWIS, G. S., LEBLANC, S. & GILBERT, R. O. 2006.
Defining postpartum uterine disease in cattle.
Theriogenology, 65, 1516-1530.

Literaturverzeichnis

- SHIN, E. K., JEONG, J. K., CHOI, I. S., KANG, H. G., HUR, T. Y., JUNG, Y. H. & KIM, I. H. 2015.
Relationships among ketosis, serum metabolites, body condition, and reproductive outcomes in dairy cows.
Theriogenology, 84, 252-260.
- SHINTON, N. K., ENGLAND, J. M. & KENNEDY, D. A. 1982.
Guidelines for the evaluation of instruments used in haematology laboratories.
Journal of clinical pathology, 35, 1095-1102.
- SIEGENTHALER, W. & AMANN-VESTI, B. R. 2006.
Klinische Pathophysiologie, Thieme.
- SIMSON, E. & GRONER, W. 1995.
Variability in absolute lymphocyte counts obtained by automated cell counters.
Cytometry, 22, 26-34.
- SIVAJOTHI, S., REDDY, B. S., KUMARI, K. N. & RAYULU, V. 2014.
Haematological changes in *Trypanosoma evansi* infected cattle.
International Journal of Scientific World, 2, 27-30.
- SMITH, B. I., KAUFFOLD, J. & SHERMAN, L. 2010.
Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders.
The Veterinary Journal, 186, 162-165.
- SMITH, V. R. & MERRILL, W. G. 1954.
Parturient Paresis. VII. A Study of the Leucocytes of Cows with Parturient Paresis.
Journal of Dairy Science, 37, 967-975.
- SOLER, L., GARCIA, N., ANDRES, M., ARMENGOL, R., LAMPREAVE, F., ALAVA, M. A. & PINEIRO, M. 2019.
Development and validation of an ELISA for the quantification of bovine ITIH4 in serum and milk.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 217, 109922.
- SORDILLO, L. M. & BABIUK, L. A. 1991.
Controlling acute *Escherichia coli* mastitis during the periparturient period with recombinant bovine interferon gamma.
Veterinary Microbiology, 28, 189-198.
- SORDILLO, L. M., CAMPOS, M. & BABIUK, L. A. 1991a.
Antibacterial Activity of Bovine Mammary Gland Lymphocytes Following Treatment with Interleukin-21.
Journal of Dairy Science, 74, 3370-3375.
- SORDILLO, L. M., CONTRERAS, G. A. & AITKEN, S. L. 2009.
Metabolic factors affecting the inflammatory response of periparturient dairy cows.
Animal Health Research Reviews, 10, 53-63.
- SORDILLO, L. M. & PEEL, J. E. 1992.
Effect of Interferon- γ on the Production of Tumor Necrosis Factor During Acute *Escherichia coli* Mastitis.
Journal of Dairy Science, 75, 2119-2125.
- SORDILLO, L. M., PIGHETTI, G. M. & DAVIS, M. R. 1995.
Enhanced production of bovine tumor necrosis factor- α during the periparturient period.
Veterinary Immunology and Immunopathology, 49, 263-270.

Literaturverzeichnis

- SORDILLO, L. M. & RAPHAEL, W. 2013.
Significance of Metabolic Stress, Lipid Mobilization, and Inflammation on Transition Cow Disorders.
Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, 29, 267-278.
- SORDILLO, L. M., SNIDER, M., HUGHES, H., AFSETH, G., CAMPOS, M. & BABIUK, L. A. 1991b.
Pathological Changes in Bovine Mammary Glands Following Intramammary Infusion of Recombinant Interleukin-2.
Journal of Dairy Science, 74, 4164-4174.
- SPILLER, A. 2015.
Wege zu einer gesellschaftlich akzeptierten Nutztierhaltung.
Berichte über Landwirtschaft - Zeitschrift für Agrarpolitik und Landwirtschaft, 221.
- STAUFENBIEL, R., GELFERT, C. & PANICKE, L. 2004a.
Prophylaktische veterinärmedizinische Bestandbetreuung als Maßnahme im Management von Milchkühen.
Züchtungskunde, 76.
- STAUFENBIEL, R., LÖPTIEN, A., MONTAG, N., PASSFELD, M. & GOEBBELS, M. Year.
Published. Aktualisierte Empfehlungen zur Anwendung von Anionenrationen (sauren Salzen) zur Prophylaxe der Hypokalzämie und Gebärparese der Milchkuh.
Vortragsband: Dr. Pieper Tagungsbericht 2004 8. Symposium Fütterung und Management von Kühen mit hohen Leistungen, Neuruppin, 2004b. 121-169.
- STAUFENBIEL, R. & SCHRÖDER, U. 2004.
Körperkonditionsbeurteilung durch Ultraschallmessung der Rückenfettdicke.
Veterinär-Spiegel : Forum für Praxis und Praxismanagement, 2, 149-155.
- STAUFENBIEL, R., SCHRÖDER, U., GELFERT, C. & PANICKE, L. 2003.
Körperkondition und Stoffwechselstabilität als Grundlage für eine hohe Milchleistung bei ungestörter Fruchtbarkeit und allgemeiner Gesundheit von Milchkühen.
Archiv für Tierzucht Dummerdorf, 46, 513-526.
- STAUFENBIEL, R., STAUFENBIEL, B., ROSSOW, N., KLUKAS, H. & JOHANNSEN, U. 1993.
Diagnosis of fatty liver in dairy cows.
Deutsche tierärztliche Wochenschrift, 100, 225-230.
- STER, C., LOISELLE, M. C. & LACASSE, P. 2012.
Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells.
Journal of Dairy Science, 95, 708-717.
- STIENE-MARTIN, E. A. 1980.
Causes for poor leukocyte distribution in manual spreader-slide blood films.
American journal of medical technology, 46, 624-632.
- SWAIN, D. K., KUSHWAH, M. S., KAUR, M. & DANG, A. K. 2015.
Neutrophil dynamics in the blood and milk of crossbred cows naturally infected with *Staphylococcus aureus*.
Veterinary world, 8, 336-345.
- 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 Veterinary Research, 11, 207.

Literaturverzeichnis

- TILSNER, V. & GREUL, W. 2013.
Hämatologie und Hämostasiologie: Kurzgefaßte Labordiagnostik und Therapie, Springer-Verlag.
- TREACHER, R. J., REID, I. M. & ROBERTS, C. J. 1986.
Effect of Body Condition at Calving on the Health and Performance of Dairy-Cows.
Animal Production, 43, 1-6.
- TREVISI, E., AMADORI, M., COGROSSI, S., RAZZUOLI, E. & BERTONI, G. 2012.
Metabolic stress and inflammatory response in high-yielding, periparturient dairy cows.
Research in Veterinary Science, 93, 695-704.
- TREVISI, E., FERRARI, A., PICCIOLI-CAPPELLI, F., GROSSI, P. & BERTONI, G. 2010.
An additional study on the relationship between the inflammatory condition at calving time and net energy efficiency in dairy cows.
International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition 489-490.
- V. BOROVIČZÉNY, K.-G., HEIMPEL, H., PRÜMMER, O., FINK, P. C. & TRENDELENBURG, C. 1991.
Einleitung.
In: BOLL, I. & HELLER, S. (eds.) Praktische Blutzellendiagnostik. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- VALENCIANO, A. C., DACVP, D. M. & COWELL, R. L. 2013.
Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat-E-Book, Mosby.
- VAN FURTH, R. & COHN, Z. A. 1968.
The origin and kinetics of mononuclear phagocytes.
Journal of Experimental Medicine, 128, 415-35.
- VAN LEEUWEN, M. W. & TESKE, E. 1999.
The hematologic analyzer Vet ABC: evaluation of its use for dogs and cats.
Tijdschr Diergeneeskd, 124, 306-309.
- VAN SAUN, R. J. 2016.
Indicators of dairy cow transition risks: Metabolic profiling revisited.
Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere Nutztiere, 44, 118-26; quiz 127.
- VAN SCHYNDEL, S. J., CARRIER, J., PASCOTTINI, O. B. & LEBLANC, S. J. 2018.
The effect of pegbovigrastim on circulating neutrophil count in dairy cattle: A randomized controlled trial.
Plos One, 13, 8.
- VIEIRA-NETO, A., LIMA, I. R. P., LOPES, F., LOPERA, C., ZIMPEL, R., SINEDINO, L. D. P., JEONG, K. C., GALVÃO, K., THATCHER, W. W., NELSON, C. D. & SANTOS, J. E. P. 2017.
Use of calcitriol to maintain postpartum blood calcium and improve immune function in dairy cows.
Journal of Dairy Science, 100, 5805-5823.
- VIS, J. Y. & HUISMAN, A. 2016.
Verification and quality control of routine hematology analyzers.
International Journal of Laboratory Hematology, 38, 100-109.

Literaturverzeichnis

VIVES CORRONS, J. L., ALBAREDE, S., FLANDRIN, G., HELLER, S., HORVATH, K., HOUWEN, B., NORDIN, G., SARKANI, E., SKITEK, M., VAN BLERK, M. & LIBEER, J. C. 2004.

Guidelines for blood smear preparation and staining procedure for setting up an external quality assessment scheme for blood smear interpretation. Part I: Control material. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 42, 922-926.

WANG, J., ZHU, X., SHE, G., KONG, Y., GUO, Y., WANG, Z., LIU, G. & ZHAO, B. 2018. Serum hepatokines in dairy cows: periparturient variation and changes in energy-related metabolic disorders.

BMC Veterinary Research, 14, 236.

WARDLAW, S. C. & LEVINE, R. A. 1983.

Quantitative Buffy Coat Analysis: A New Laboratory Tool Functioning as a Screening Complete Blood Cell Count.

JAMA, 249, 617-620.

WEAVER, A. D. 1954.

THE DEVELOPMENT of the Knowledge of the leukocyte.

Bulletin of the New York Academy of Medicine, 30, 988-992.

WEAVER, A. D., ATKINSON, O., JEAN, G. S. & STEINER, A. 2018.

Bovine surgery and lameness, John Wiley & Sons.

WEBER, T. B. & RUBIN, R. 1958.

The Eosinophilic Response to Infection with the Cattle Lungworm, *Dictyocaulus viviparus*.

The Journal of Infectious Diseases, 102, 214-218.

WEGNER, T. N., SCHUH, J. D., NELSON, F. E. & STOTT, G. H. 1976.

Effect of Stress on Blood Leucocyte and Milk Somatic Cell Counts in Dairy Cows¹.

Journal of Dairy Science, 59, 949-956.

WEISER, M. G., VAP, L. M. & THRALL, M. A. 2007.

Perspectives and Advances in In-Clinic Laboratory Diagnostic Capabilities: Hematology and Clinical Chemistry.

Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice, 37, 221-236.

WEISS, D. J. & WARDROP, K. J. 2011.

Schalm's veterinary hematology, John Wiley & Sons.

WILLARD, M. D., TVEDTEN, H. & TURNWALD, G. H. 1989.

Small animal clinical diagnosis by laboratory methods, WB Saunders company.

WILLIAMS, W. & SCHNEIDER, A. 1972.

Examination of the peripheral blood.

Hematology, 1.

WINTROBE, M. M. 1939.

Diagnostic Significance of Changes in Leukocytes.

Bulletin of the New York Academy of Medicine, 15, 223-240.

WITTEK, K. 2002.

Auswirkungen einer einmaligen Glucocorticoidapplikation im postpartalen Zeitraum beim Rind auf ausgewählte hämatologische, Stoffwechsel- und immunologische Parameter.

Literaturverzeichnis

- WOOD, D. & QUIROZ-ROCHA, G. 2010. Schalm's Veterinary Hematology. Vol Normal hematology of cattle. 6th ed. Douglas J. Weiss, K Jane Wardrop.
- YAMAKUCHI, H., AGABA, M., HIRANO, T., HARA, K., TODOROKI, J., MIZOSHITA, K., KUBOTA, C., TABARA, N. & SUGIMOTO, Y. 2000.
Chediak-Higashi syndrome mutation and genetic testing in Japanese black cattle (Wagyu).
Animal Genetics, 31, 13-19.
- ZAAIJER, D. & NOORDHUIZEN, J. 2003.
A novel scoring system for monitoring the relationship between nutritional efficiency and fertility in dairy cows.
- ZAPEL, E. 1937.
Die Technik der klinisch-diagnostischen Untersuchungsmethoden.
Tuberkulose. Springer.
- ZERBE, H., SCHNEIDER, N., LEIBOLD, W., WENSING, T., KRUIP, T. A. M. & SCHUBERTH, H. J. 2000.
Altered functional and immunophenotypical properties of neutrophilic granulocytes in postpartum cows associated with fatty liver.
Theriogenology, 54, 771-786.
- ZHANG, S., YANG, F., OGUEJIOFOR, C. F., WANG, D., DONG, S. & YAN, Z. 2018a.
Endometrial expression of the acute phase molecule SAA is more significant than HP in reflecting the severity of endometritis.
Research in Veterinary Science, 121, 130-133.
- ZHANG, Y., LI, X., ZHANG, H., ZHAO, Z., PENG, Z., WANG, Z., LIU, G. & LI, X. 2018b.
Non-Esterified Fatty Acids Over-Activate the TLR2/4-NF-Kappab Signaling Pathway to Increase Inflammatory Cytokine Synthesis in Neutrophils from Ketotic Cows.
Cellular Physiology and Biochemistry, 48, 827-837.
- ZIMMERMANN, S. 2016.
Pegbovigrastim - An innovative active ingredient which restores the immune function of transition cows.
Tieraerztliche Umschau, 71, 396-403.

10 Anhang

Intraday- und Interday-Fehler der stabkernigen neutrophilen Granulozyten und der Monozyten

Tabelle 64: Methodische Fehler bei der Differenzierung der stabkernigen Granulozyten

												<i>Intraday</i>		
Messung		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SD	M	VK
Tag														
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,316	0,100	(3,162)
	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0,316	0,100	(3,162)
	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,316	0,100	(3,162)
	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,316	0,100	(3,162)
	10	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0,422	0,200	(2,108)
<i>Interday</i>	SD	0,422	0,000	0,000	0,000	0,316	0,000	0,483	0,000	0,000	0,000	M	0,060	(2,951)
	M	0,200	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,300	0,000	0,000	0,000	M	0,060	
	VK	(2,108)	-	-	-	(3,162)	-	(1,610)	-	-	-			(2,294)

Anhang

Tabelle 65: Methodische Fehler bei der Differenzierung der Monozyten

Messung Tag												Intraday		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	SD	M	VK
1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
4		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
5		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
7		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0,316	0,100	(3,162)
8		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
9		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0,316	0,100	(3,162)
10		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,000	0,000	-
Interday	SD	0,000	0,000	0,000	0,316	0,000	0,316	0,000	0,000	0,000	0,000	M	0,020	(3,162)
	M	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,100	0,000	0,000	0,000	0,000	M	0,020	
	VK	-	-	-	(3,162)	-	(3,162)	-	-	-	-		(3,162)	

Anhang

Variationskoeffizient der einzelnen Präparate an drei verschiedenen Differenzierungsdurchgängen

Tabelle 66: Variationskoeffizient der jeweiligen Präparate beim ersten Differenzierungsdurchgang (10-mal jedes Präparat)

<i>Präparat</i>	<i>Lymphozyten</i>	<i>Monozyten</i>	<i>Segmentkernige</i>	<i>Stabkernige</i>	<i>Eosinophile</i>
1	0,121	2,108	0,078	-	0,515
2	0,112	2,108	0,065	-	0,471
3	0,26	3,16	0,056	1,610	1,610
4	0,195	-	0,038	0,428	-
5	0,084	-	0,115	0,986	-
6	0,129	2,108	0,129	0,329	1,291
7	0,08	2,108	0,197	-	0,235
8	0,067	-	0,021	3,162	0,316
9	0,092	-	0,074	3,162	0,787
10	0,121	2,108	0,078	-	0,515
MW	0,1	2,3	0,1	1,6	0,7
SD	0,06	0,43	0,05	1,28	0,49

Anhang

Tabelle 67: Variationskoeffizient der jeweiligen Präparate beim zweiten Differenzierungsdurchgang (10-mal jedes Präparat)

<i>Präparat</i>	<i>Lymphozyten</i>	<i>Monozyten</i>	<i>Segmentkernige</i>	<i>Stabkernige</i>	<i>Eosinophile</i>
1	0,085	-	0,068	0,904	0,351
2	0,144	-	0,056	1,7	0,547
3	0,175	2,108	0,029	1,17	1,176
4	0,132	-	0,036	0,570	2,108
5	0,056	1,610	0,066	0,815	-
6	0,157	3,162	0,033	0,238	1,414
7	0,058	1,610	0,166	3,162	0,225
8	0,095	1,419	0,049	-	0,383
9	0,104	2,108	0,069	1,176	0,791
10	0,085	-	0,068	0,903	0,351
MW	0,1	2,0	0,1	1,2	0,8
SD	0,04	0,63	0,04	0,85	0,63

Anhang

Tabelle 68: Variationskoeffizient der jeweiligen Präparate beim dritten Differenzierungsdurchgang (10-mal jedes Präparat)

<i>Präparat</i>	<i>Lymphozyten</i>	<i>Monozyten</i>	<i>Segmentkernige</i>	<i>Stabkernige</i>	<i>Eosinophile</i>
1	0,068	-	0,042	3,162	0,418
2	0,102	-	0,041	3,162	0,408
3	0,148	-	0,029	1,165	1,000
4	0,138	-	0,029	0,457	1,610
5	0,056	-	0,080	0,768	2,108
6	0,129	-	0,040	0,168	1,291
7	0,056	1,405	0,174	3,162	0,311
8	0,129	1,7	0,061	-	0,346
9	0,08	2,108	0,063	1,748	0,602
10	0,068	-	0,042	3,162	0,418
MW	0,1	1,7	0,1	1,9	0,9
SD	0,04	0,35	0,04	1,29	0,63

Anhang

Absolute und relative Werte der basophilen und juvenilen Granulozyten zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten

Für die basophilen Granulozyten ergeben sich an den jeweiligen Tagen folgende Anzahlen N an beprobten Studienkühen: N(-14)=139; N(3)=81; N(8)=167; N(28)=176; N(60)=171; N(100)=63 für die prozentualen Werte. Für die absoluten Werte wurden folgende Anzahl an Studienkühe einbezogen: N(-14)=138; N(3)=80; N(8)=166; N(28)=176; N(60)=170; N(100)=61.

Bei den relativen Werten der juvenilen Granulozyten wurden an den jeweiligen Tagen folgende Anzahlen N an Studienkühen beprobten: N(-14)=139; N(3)=81; N(8)=167; N(28)=176; N(60)=171; N(100)=63. Für die absoluten Werte wurden folgende Anzahl an Studienkühe einbezogen: N(-14)=139; N(3)=80; N(8)=166; N(28)=176; N(60)=171; N(100)=63.

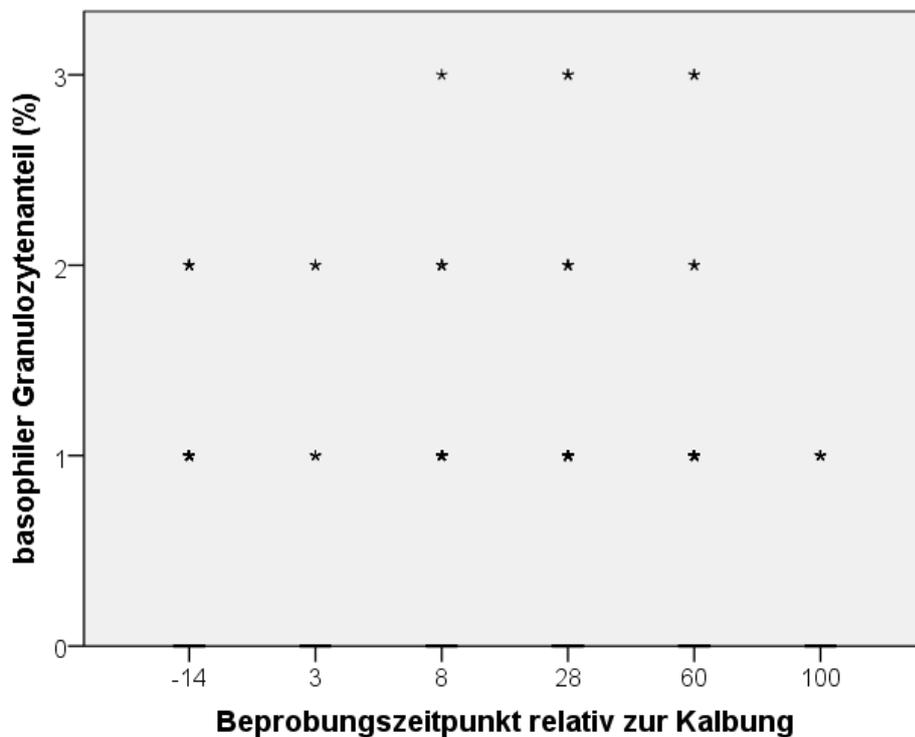


Abbildung 12: Basophiler Granulozytenanteil (in %) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Anhang

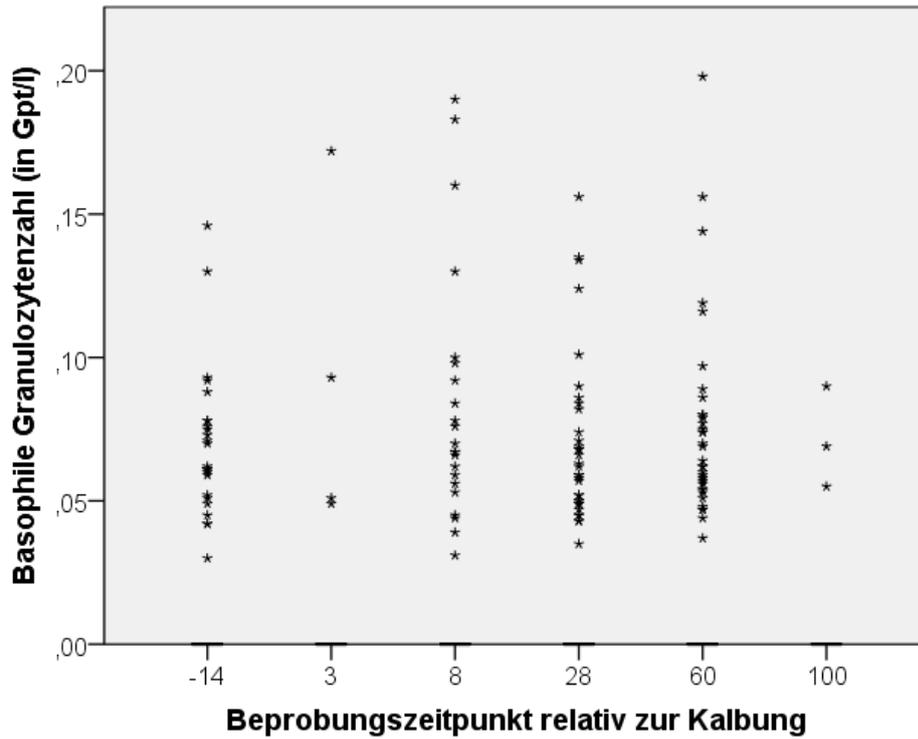


Abbildung 13: Basophile Granulozytenanzahl (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

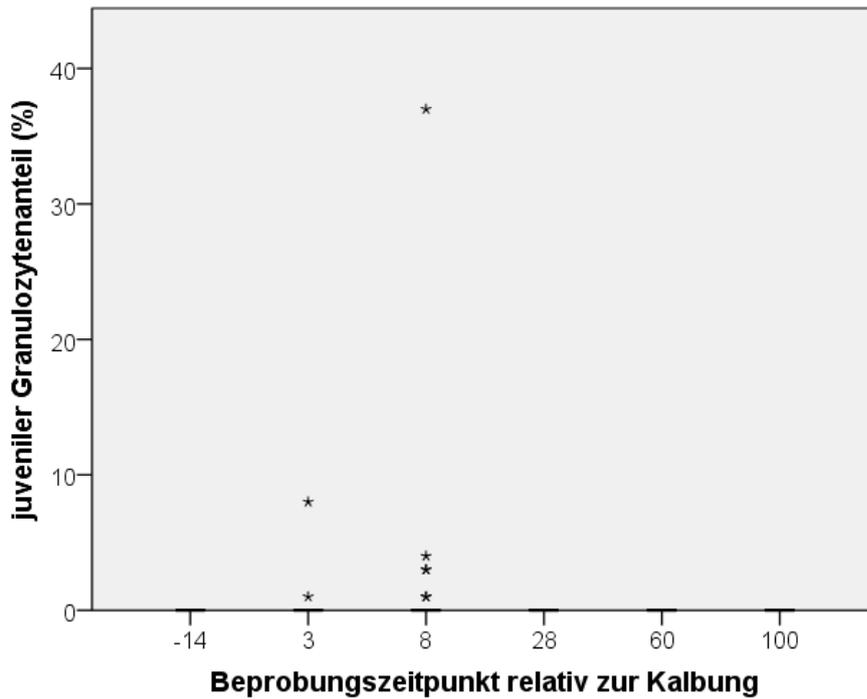


Abbildung 14: Juveniler Granulozytenanteil (in %) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Anhang

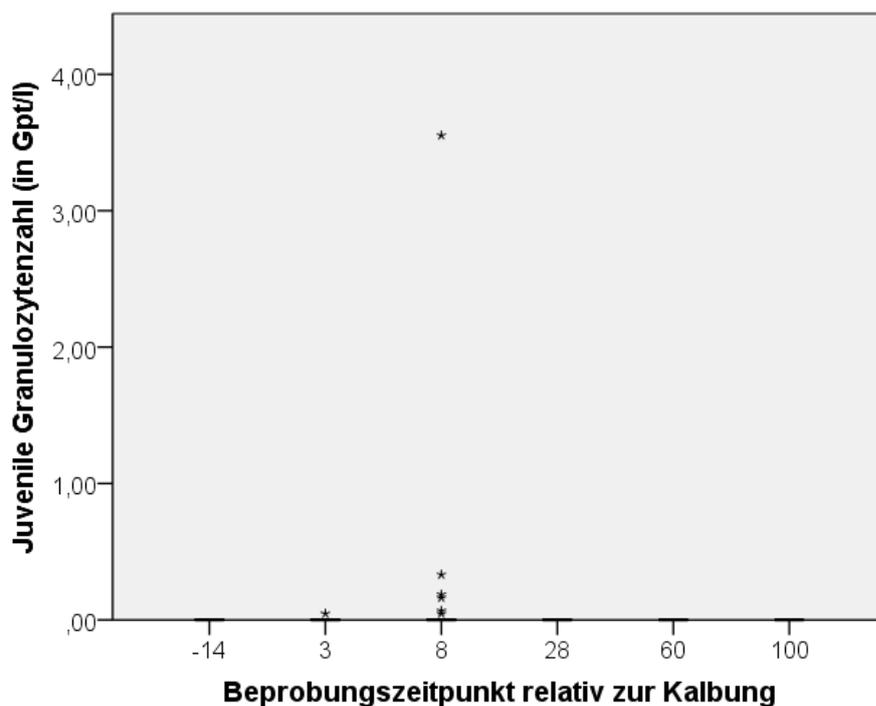


Abbildung 15: Juvenile Granulozytenanzahl (in Gpt/l) zu den jeweiligen Beprobungszeitpunkten relativ zur Kalbung (in d)

Tabelle 69: Mann-Whitney-U-Test zur Ermittlung des Einflusses von NGV auf die WBC zu den jeweiligen Beprobungstagen

<i>WBC zu den Beprobungstagen</i>	<i>p-Wert</i>
<i>14d a.p.</i>	,549
<i>3d p.p.</i>	<i>Berechnung nicht möglich</i>
<i>8d p.p.</i>	,009
<i>28d p.p.</i>	,511
<i>60d p.p.</i>	,316
<i>100d p.p.</i>	<i>Berechnung nicht möglich</i>

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

Tabelle 70: Mann-Whitney-U-Test zur Ermittlung des Einflusses von NGV und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (absolute Werte) für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>Segmentkernige Granulozyten zu den Beprobungstagen</i>	<i>p-Wert</i>
<i>14d a.p.</i>	,734
<i>3d p.p.</i>	<i>Berechnung nicht möglich</i>
<i>8d p.p.</i>	,000
<i>28d p.p.</i>	,762
<i>60d p.p.</i>	,421
<i>100d p.p.</i>	<i>Berechnung nicht möglich</i>

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

Anhang

Tabelle 71: Mann-Whitney-U-Test zur Ermittlung des Einflusses von NGV auf Monozyten zu den jeweiligen Beprobungstagen

<i>Monozyten zu den Beprobungstagen</i>	<i>p-Wert</i>
<i>14d a.p.</i>	,040
<i>3d p.p.</i>	,355
<i>8d p.p.</i>	,075*
<i>28d p.p.</i>	,967
<i>60d p.p.</i>	,177
<i>100d p.p.</i>	,837

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

Tabelle 72: Zusammenhang zwischen Totgeburten und Lymphozyten für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>Lymphozyten (in Gpt/l)</i>	<i>t-Test</i>	
	<i>p</i>	<i>Mittelwertdifferenz zwischen gesunden und Kühen mit Totgeburten</i>
<i>14d a.p.</i>	0,935	-0,03306
<i>3d p.p.</i>	0,069*	-1,09426
<i>8d p.p.</i>	0,900	0,05072
<i>28d p.p.</i>	0,511	0,23876
<i>60d p.p.</i>	0,331	-0,40777
<i>100d p.p.</i>	0,625	-0,21843

Anhang

Tabelle 73: Zusammenhang zwischen Totgeburten und WBC für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>WBC zu den Beprobungstagen (in Gpt/l)</i>	<i>p-Wert</i>
<i>14d a.p.</i>	0,153
<i>3d p.p.</i>	,963 ^a
<i>8d p.p.</i>	0,116
<i>28d p.p.</i>	0,110
<i>60d p.p.</i>	0,394
<i>100d p.p.</i>	,700 ^a

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

Tabelle 74: Zusammenhang zwischen Totgeburten und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten für die jeweiligen Beprobungszeitpunkte

<i>Segmentkernige Granulozyten zu den Beprobungstagen (in Gpt/l)</i>	<i>p-Wert</i>
<i>14d a.p.</i>	0,115
<i>3d p.p.</i>	,629 ^a
<i>8d p.p.</i>	0,106
<i>28d p.p.</i>	0,180
<i>60d p.p.</i>	0,848
<i>100d p.p.</i>	,300 ^a

Asymptotische Signifikanzen werden angezeigt. Das Signifikanzniveau ist 0,050.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere gilt mein Dank Univ.-Prof. Dr. Rudolf Staufenbiel für das Überlassen des Themas und den allzeit gewährten Rat.

Ganz besonderer Dank gilt zudem meinen Eltern, die mich motiviert haben und mir oft den Rücken freihielten sowie meiner Freundin.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Baeumer und Herrn Dr. Hilmert für die gute Einarbeitung im Labor bedanken.

Herzlicher Dank gilt auch meinen Kollegen und Freunden Dr. Laura Pieper, Dr. Stefan Borchardt und Philipp Zuz für jegliche Unterstützung und Motivation.

Für die technische Unterstützung gebührt Herrn Dr. Ripp mein Dank.

12 Selbstständigkeitserklärung

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 24.06.2020

Rudi Barthmann



FU Berlin