

III. Material und Methoden

Über einen Zeitraum von Januar 1997 bis Januar 2003 wurden in dieser retrospektiven Studie alle Hunde, die in der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin vorgestellt wurden und bei denen der Nachweis auf Tc-gebundene Antikörper positiv ausfiel, erfasst. Eine weitere Voraussetzung für die Aufnahme in die Studie war eine vollständige Krankengeschichte. Patienten mit unzureichender Dokumentation wurden ausgeschlossen. In die Studie flossen alle Patienten aus der Dissertation von ENGELBRECHT (2001), in der Patienten mit ITP über einen Zeitraum von 2 Jahren prospektiv verfolgt wurden, ein.

Folgende Parameter wurden ausgewertet:

1. Signalement, Anamnese und klinische Untersuchung

Bei der Anamnese wurde insbesondere auf folgende Fragestellungen geachtet: Vorstellungsgrund, Blutungsanzeichen, Erkrankungsdauer, Auslandsaufenthalt, Impfstatus und medikamentelle Vorbehandlung. Bei der klinischen Allgemeinuntersuchung wurden folgende Punkte erfasst: Gesamteindruck des Tieres, Rektaltemperatur, Farbe der Schleimhäute, kapilläre Füllungszeit, Palpation der Lymphknoten und des Abdomens sowie Blutungsanzeichen.

2. Radiologische und sonographische Untersuchung

Ausgewertet wurden die Befunde der radiologischen und sonographischen Untersuchung des Abdomens sowie der radiologischen Untersuchung des Thorax. Für die Untersuchungen wurde das Ultraschallgerät Sigma 110 (Firma (Fa.) KONTRON INSTRUMENTS, Montigny le Bretonneux) und das Röntgengerät Tridoros Optimatic 800 (Fa. SIEMENS AG, Forchheim) verwendet.

3. Laboruntersuchungen

3.1 Hämatologische Untersuchung

Die hämatologische Blutuntersuchung wurde an der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin durchgeführt. Die Blutentnahme erfolgte aus der Vena cephalica, Vena saphena oder aus der Vena jugularis. Es wurden EDTA-Röhrchen (Fa. SARSTEDT, Nümbrecht) verwendet. Bei

einem Patienten, der später beim Haustierarzt weiter betreut wurde, wurde ein Teil der Blutbilder in einem Fremdlabor durchgeführt.

Folgende Parameter wurden ausgewertet: Leukozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobin, Erythrozytenzahl, Erythrozytenindizes (MCV, MCHC), Thrombozytenzahl und MPV.

Die hämatologische Untersuchung wurde von 01/1997 – 12/1997 mit dem automatischen Blutzellgerät TECHNICON H 1 (Fa. BAYER, Leverkusen) und von 12/1997 – 01/2003 mit dem automatischen Multiparameter-Hämatologie-Analysegerät CELL DYN 3500 (Fa. ABBOTT, Wiesbaden-Delkenheim) durchgeführt. Während des Notdienstes wurde die Hämatologie an dem Cell-Analyzer CA-530 Vet. (Fa. MENARINI Diagnostics, Neuss) durchgeführt.

Bei Vorliegen einer starken Erythrozytenagglutination wurde der Mikro-Hämatokrit bestimmt, um falsch niedrige Messergebnisse der Hämatologie-Analysegeräte zu erkennen. Dafür wurden die Blutproben in Mikro-Hämatokritröhrchen (Fa. BRAND, Wertheim) mittels Kapillarkraft gesogen und in der Zentrifuge („Haemofuge“, Fa. HERAEUS SEPATECH, Berlin) 10 Minuten bei 12.000 U/min zentrifugiert.

Der Referenzbereich für die hämatologische Untersuchung ist in Tabelle (Tab.) 1 angegeben.

Tab. 1: Referenzbereich für die hämatologische Untersuchung (ROLEFF, 2004), ¹nach KRAFT (2005), ²nach PRATER u. TVEDTEN (2004).

Parameter	Referenzbereich
Leukozytenzahl ¹ (G/l)	6-15
Erythrozytenzahl (T/l)	5,6-8,6
Hämoglobin (mmol/l)	8,4-12,4
Hämatokrit (l/l)	0,38-0,57
MCV (fl)	62-72
MCHC (mmol/l)	19-23
Thrombozyten ¹ (G/l)	150-500
Retikulozytenzahl (absolut) ¹ (/µl)	bis 60.000
MPV ² (fl)	6-9

Blutausstriche zur Beurteilung des Differentialblutbildes (Tab. 2) und der Erythrozytenmorphologie wurden nach May-Grünwald gefärbt. Zur Retikulozytenzählung wurde eine Brillantkresylblaufärbung (Fa. SARSTEDT, Nümbrecht) herangezogen. Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop OLYMPUS CX31 (Fa. OLYMPUS COOPERATION, Tokyo).

Tab. 2: Referenzbereich für das Differentialblutbild (KRAFT, 2005)

Parameter	Referenzbereich	
	relative Zahlen (%)	absolute Zahlen ($\times 10^6/l$)
Stabkernige neutrophile Granulozyten	0-4	0-500
Segmentkernige neutrophile Granulozyten	55-75	3.000-9.000
Lymphozyten	13-30	1.000-3.600
Monozyten	0-4	40-500
Eosinophile Granulozyten	0-6	40-600
Basophile Granulozyten	selten (bis 1)	0-100

Bei Vorliegen einer spontanen Erythrozytenagglutination erfolgte ein dreimaliges Waschen der roten Blutkörperchen. Hierzu wurde zunächst das EDTA-Blut zentrifugiert (1-2 Minuten bei 1000 x g) und das Plasma abpipettiert. Anschließend wurden die Erythrozyten mit physiologischer NaCl-Lösung oder PBS-Lösung (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) (DULBECCO, Fa. BIOCHROM, Berlin) vermischt, erneut zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Der Grad der Agglutination wurde mit 1+, 2+ und 3+ beurteilt. Wenn makroskopisch keine Agglutination erkennbar war, wurde zusätzlich mikroskopisch untersucht.

3.2 Knochenmarkuntersuchung

Das Knochenmark wurde aus dem Tuberculum majus humeri entnommen und anschließend zur Beurteilung der Ausstriche nach May-Grünwald gefärbt. Bei der Auswertung achtete man vor allem auf das Vorhandensein von Megakaryozyten. Beurteilt wurde, ob reichlich oder nur wenige Megakaryozyten im Knochenmarkausstrich vorhanden waren.

3.3 Klinische Chemie

Zur Bestimmung von Kreatinin, AP, AST, ALT, GLDH, Bilirubin, Protein und Albumin im Heparin-Plasma wurde das Analysegerät COBAS MIRA PLUS (Fa. ROCHE Diagnostica, Grenzach-Wyhlen) verwendet. Mit dem ELECTROLYTE-14+-Analyser (Fa. NOVA BIOMEDICALS, Rödermark) wurden Na, K, Glukose und Harnstoff gemessen. Die Referenzbereiche für die klinische Chemie sind in Tab. 3 angegeben.

Tab. 3: Referenzbereich für die klinische Chemie (laborinterner Referenzbereich)

Parameter	Referenzbereich
Natrium (mmol/l)	140 – 150
Kalium (mmol/l)	3,5 – 5,1
Glukose (mmol/l)	3,9 – 6,7
Harnstoff (mmol/l)	3,5 – 10
Kreatinin (µmol/l)	< 124
ALT (IU/l)	- 76
AST (IU/l)	- 41
GLDH (IU/l)	- 8,6
AP (IU/l)	- 108
Bilirubin (µmol/l)	- 5,13
Protein (g/l)	54 – 66
Albumin (g/l)	28 – 36
Kalzium (mmol/l)	2,3 – 3,0
Phosphor (mmol/l)	0,7 – 1,6

3.4 Harnuntersuchung

Zur Untersuchung des Urins wurden die Harnteststreifen Combur⁹-Test (Fa. BOEHRINGER, Mannheim) verwendet. Nach Zentrifugation des Urins erfolgte die Beurteilung des Harnsedimentes bei 40-facher Vergrößerung mit einem Lichtmikroskop.

3.5 Gerinnung

Die Bestimmung der plasmatischen Gerinnung erfolgte nach Standardverfahren mit dem Koagulometer nach SCHNITGER und GROSS (Fa. AMELUNG, Lemgo). Für die Durchführung wurde für die Thromboplastinzeit das Reagenz „Hepato-Quick“ (Fa. ROCHE, Diagnostica Stago, Mannheim) und für die aktivierte partielle Thromboplastinzeit das Reagenz „Pathromtin“ (Fa. DADE BEHRING, Marburg) verwendet. Als Referenzbereich wurden laboreigene Werte herangezogen (Tab. 4).

Da zahlreiche Tiere im Notdienst in der Klinik vorgestellt wurden, wurden die Proben zum Teil eingefroren (-20°C), um sie am nächsten Morgen in der Routinediagnostik zu bestimmen.

Tab. 4: Referenzbereich für die plasmatische Gerinnung (STOCKHAUS, 1998).

Parameter	Referenzbereich
PT	14,6-21,0 sec
aPTT	13,2-18,2 sec

3.6 Direkter Coombs-Test (Direkter Antiglobulin-Test, DAT)

Der Nachweis von antierythrozytären Antikörpern bzw. Komplement auf der Erythrozytenoberfläche erfolgte bei einem Teil der Patienten an der Klinik für kleine Haustiere der FU Berlin, ansonsten an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Immunologie).

Zur Durchführung des Coombs-Tests wurden die Erythrozyten dreimal mit Phosphate Buffered Saline (PBS, DULBECCO, Fa. BIOCHROM, Berlin) gewaschen. Anschließend wurde eine Erythrozytenverdünnung hergestellt, bei der 25 µl der gewaschenen Erythrozyten mit 925 µl R2F-Lösung (Fa. BIOCHROM, Berlin) gemischt wurden.

Es wurden monospezifische Antiseren verwendet: rabbit-anti-dog IgG (H+L) (Fa. DIANOVA, Hamburg), goat-anti-dog IgM (Fa. ICN BIOMEDICALS, Eschwege) und goat-anti-dog C3b (Fa. ICN BIOMEDICALS, Eschwege). Für jedes Antiserum wurde mit PBS eine Verdünnungsreihe von 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640, 1:1280, 1:2560, 1:5120 und 1:10240, und für C3b nur eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis 1:2560 hergestellt. Die Ansätze wurden als Kalt- (4°C) und Warmansatz (37°C) in 96-fach Rundboden-Mikrotiterplatten (Fa. SARSTEDT, Nümbrecht) durchgeführt. In jeden Ansatz der einzelnen Verdünnungsstufe wurden 20 µl eines jeden Antiserums pipettiert und 20 µl der Erythrozytenverdünnung zugegeben. Bei entsprechender Temperatur wurden die Ansätze eine Stunde inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 20 µl PBS und 20 µl 10%iges fetales Kälberserum (Fa. BIOCHROM, Berlin) verwendet. Der Test wurde als positiv beurteilt, wenn eine Erythrozytenagglutination eintrat.

3.7 Nachweis Tc-gebundener Antikörper

Die Durchführung erfolgte an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Immunologie). Als Testprinzip diente die Durchflusszytometrie mit Doppelfluoreszenz (Gerät: FACScan, Fa. BECTON-DICKINSON, Heidelberg).

Die Tc-Population wurde aufgrund von Größe und Komplexität (d.h. Granularität und Oberflächenrelief der Tc) definiert.

Nach Separierung und Waschung der Thrombozyten wurden die Tc mit einem monoklonalen AK gegen Tc-Antigene (mAK 17-15, Code: 3W-098) und einem Phycoerythrin-konjugierten polyklonalen AK (rotfluoreszierender AK) gegen Mausimmunglobuline markiert, um andere Partikel in Tc-Größe (z.B. Erythrozytenfragmente) von Tc zu unterscheiden und dadurch von der Untersuchung auszuschließen. Mit Hilfe eines Fluoreszein-konjugierten polyklonalen AK

(goat-anti-dog IgG [H+L]) gegen canines Immunglobulin (grünfluoreszierender AK) wurden jene Tc ermittelt, die mit Antikörpern beladen waren. Mit jeder Patientenprobe (ca. 2-5 ml EDTA-Blut) wurde Kontrollblut eines gesunden Hundes mitversandt (über Nacht, ungekühlt) und gleichzeitig, d.h. innerhalb von 24 Stunden nach der Blutentnahme, untersucht.

3.8 Infektionstiter

Bei den meisten Hunden erfolgte eine Serum-Antikörperbestimmung gegen Babesien (*B. canis*), Ehrlichien (*E. canis*), z.T. auch gegen Leishmanien, Dirofilarien (*D. immitis*) und Borrelien. Die Bestimmung wurde meist am Institut für Vergleichende Tropenmedizin und Parasitologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Einige Proben wurden zu LABOKLIN (Labor für klinische Diagnostik GmbH, Bad Kissingen) geschickt. Als Testprinzip zum Nachweis von Dirofilarien wurde der ELISA und bei allen anderen Bestimmungen die Immunfluoreszenz angewendet.

3.9 Antinukleäre Antikörper (ANA)

Der Nachweis von antinukleären Antikörpern (ANA) erfolgte an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Immunologie). In einem Zweischichtverfahren wurde ein Monolayer (Humanepithelien) zuerst mit Patientenserum und anschließend mit speziesspezifischen, fluoreszenzgekoppelten Antikörpern überschichtet. Ausgewertet wurde der Test mit dem Fluoreszenzmikroskop. Ein positives Testergebnis lag bei einem Titer von $\geq 1:100$ vor.

4. Einteilung in Krankheitsgruppen

Nach Auswertung sämtlicher Daten erfolgte die Einteilung der Patienten in verschiedene Krankheitsgruppen:

1. Primäre immunbedingte Thrombozytopenie (pITP):

Die Diagnose basierte auf einem positiven Nachweis Tc-gebundener AK und dem bestmöglichen Ausschluss aller Ursachen für eine sekundäre ITP.

2. Evans' Syndrom:

Hunde mit Evans' Syndrom wiesen zusätzlich zum positiven Nachweis Tc-gebundener AK einen positiven Coombs-Test oder eine persistierende

Erythrozytenagglutination auf. Die Diagnose erfolgte durch Ausschluss sämtlicher Ursachen für eine sekundäre ITP und sekundäre IHA.

3. Sekundäre immunbedingte Thrombozytopenie (sITP)

Bei Hunden mit einer sITP lag eine Grundkrankheit bzw. ein auslösender Stimulus vor, der zur AK-Bildung auf der Tc-Oberfläche geführt haben könnte.

4. Sekundäre immunbedingte Thrombozytopenie + sekundäre immunhämolytische Anämie (sITP+sIHA):

Hunde mit einer ITP und IHA, bei denen eine Grunderkrankung bzw. ein auslösender Stimulus für die AK-Bildung vermutet wurde, wurden in die Krankheitsgruppe sITP+sIHA eingeteilt.

5. Therapie

Die Therapie und der Krankheitsverlauf wurde nur bei Hunden, die an einer pITP oder einem Evans' Syndrom erkrankt waren, ausgewertet.

Aufgrund der Tc-penie, Blutungen und / oder wegen schlechten Allgemeinbefindens mussten einige Hunde zur Intensivbetreuung und Ruhighaltung stationär aufgenommen werden. Ausgewertet wurde hierbei die Anzahl der Hunde, bei denen ein stationärer Aufenthalt erforderlich war sowie die Dauer des stationären Aufenthaltes.

Die Therapie der Patienten bestand in der Gabe von Antibiotika (Doxycyclin 5 mg/kg 2x/d p.o., Amoxicillin + Clavulansäure 12,5 mg/kg 2x/d p.o. und / oder Enrofloxacin 5 mg/kg 1x/d p.o.), H₂-Blocker (Cimetidin 5 mg/kg 3x/d i.v./p.o., Ranitidin 1 mg/kg 2x/d i.v. / p.o.) und Sucralfat (20-40 mg/kg 2x/d p.o., 1 Stunde nach den übrigen Medikamenten). Ein Teil der Hunde wurde mit Ringer-Lactat-Lösung (Erhaltungsbedarf ca. 50 ml/kg/Tag, evtl. + Mehrbedarf je nach Hydratationszustand der Hunde) behandelt. Vereinzelt wurden andere Medikamente eingesetzt (auf Art und Einsatz dieser Medikamente wird in den entsprechenden Kapitel eingegangen). Hunde mit einer ausgeprägten Anämie (Hkt ca. 0,15-0,20 l/l) bzw. wenn aufgrund von Blutungen ein rascher weiterer Hkt-Abfall zu erwarten war, wurden mit Erythrozytenkonzentrat oder Frischblut stabilisiert. Insbesondere bei Blutungen erhielten die Hunde frisches Vollblut oder Tc-reiches Plasma. Für die Auswertung der Bluttransfusionen wurde vor allem auf folgende Punkte geachtet: Zustand der Tiere (Anämie, Tc-penie, Blutungen), Blutprodukt, Transfusionsmenge und Häufigkeit der Transfusionen.

Zu Erkrankungsbeginn wurden alle Patienten (bis auf einen) mit Prednisolon (2-3 mg/kg verteilt auf 2x/d, p.o.) behandelt. Nach ungefähr 2 Wochen wurde die Prednisolon-Dosis schrittweise, ca. alle 2 Wochen um 1/4 - 1/5 unter Kontrolle der Plättchenzahlen gesenkt. Die Zytostatika Azathioprin (1,5-2 mg/kg 1x/d p.o.), Vincristin (0,5 mg/m² streng i.v., in der Regel einmalig) oder Ciclosporin (2,5 mg/kg 2x/d p.o. oder 5 mg/kg 1x/d p.o.) wurden in Kombination mit Prednisolon entweder gleich zu Beginn der Therapie oder im Laufe der Behandlung nach fehlendem Anstieg der Tc oder nach einem Rezidiv eingesetzt.

Die Hunde wurden in verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Einteilung erfolgte in Abhängigkeit vom jeweiligen Immunsuppressivum, das das Tier zu Beginn der Therapie oder kurze Zeit später nach fehlendem Anstieg der Tc erhielt.

6. Krankheitsverlauf

Der Krankheitsverlauf der Patienten wurde bei Hunden mit einer *pITP* anhand von Tc-Werten und bei Hunden mit *Evans' Syndrom* anhand von Tc- und Hkt-Werten dargestellt. Ein Ansprechen auf die Therapie (vollständige Remission) wurde wie folgt definiert: Hunde mit einer *pITP* mussten einen deutlichen Anstieg der Tc aufweisen bzw. einen Tc-Wert von ≥ 150 G/l erreichen; Hunde mit *Evans' Syndrom* sollten einen deutlichen Anstieg von Tc und Hkt aufweisen, bzw. einen Tc-Wert ≥ 150 G/l und einen Hkt-Wert $\geq 0,38$ l/l erreichen. Die Plättchenzahlen wurden zu Beginn der Erkrankung zunächst täglich, dann alle 2-3 Tage kontrolliert. Waren die Tc-Zahlen stabil (> 100 G/l), erfolgte die Kontrolle alle 1-2 Wochen, später ca. alle 4 Wochen.

Ein Rezidiv wurde bei Hunden mit einer *pITP* als ein Absinken der Tc-Zahl unter den Bereich von 150 G/l definiert, nachdem der Wert bereits im Referenzbereich angelangt war. Ein Rückfall bei Hunden mit *Evans' Syndrom* wurde als solcher gewertet, wenn die Tc-Zahl < 150 G/l und/oder der Hkt-Wert $< 0,38$ l/l sanken, nachdem sie bereits im Referenzbereich waren. In die Auswertung der Rezidivrate wurden nur Hunde einbezogen, die mindestens über einen Zeitraum von 90 Tagen in ihrem Krankheitsverlauf verfolgt wurden. Ausgewertet wurde weiterhin die Überlebensrate der Tiere in der *akuten Erkrankungsphase* (innerhalb der ersten 14 Tage) und in der *Folgezeit*.

7. Statistik

Als statistische Software wurde SPSS 12.0 (SPSS GmbH Software, München) angewendet, wobei die Auswertungen auf die explorative Datenanalyse eingeschränkt waren.

Als beschreibende Statistiken wurden Median sowie Minimal- und Maximalwerte angegeben. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots und Balkendiagramme verwendet. Ein Boxplot besteht aus einer Box, die vom ersten und dritten Quartil (25. bzw. 75. Perzentil) begrenzt wird und deren innere Linie den Median repräsentiert. Ferner werden der kleinste und größte Wert markiert, sofern sie keine Ausreißer sind. In den Boxplots sind Ausreißer mit Kreisen und Extremwerte mit Sternchen markiert. Ausreißer sind dabei Werte, die zwischen anderthalb und drei Boxlängen außerhalb der Box liegen; Extremwerte liegen mehr als drei Boxlängen außerhalb.

Um Vergleiche zwischen zwei Gruppen anzustellen, wurden Kreuztabellen erstellt und mit Hilfe des χ^2 -Tests nach Pearson ausgewertet. Ein Unterschied zwischen den Gruppen wurde als solcher gewertet, wenn die Überschreitungswahrscheinlichkeit (p) einen Wert $p < 0,05$ ergab.

Um Vergleiche bezüglich der Rezidiv- und Letalitätsrate mit der Literatur zu ermöglichen, wurden für diese Parameter Binominal-Konfidenzintervalle (Konfidenzzahl 95%) errechnet.