

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß-
und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz und dem
Zentrum für Kinderheilkunde der Justus-Liebig Universität Gießen
- Interdisziplinäre Arbeitsgruppe Perinatalogie/Neonatalogie -

**Diagnose der bakteriellen Sepsis
des bovinen Neonaten durch Amplifizierung
bakterieller 16S-ribosomaler DNA mittels
Polymerasekettenreaktion**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Eingereicht von
Irene Noll
Gießen 2003

Aus der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere
mit Tierärztlicher Ambulanz und dem
Zentrum für Kinderheilkunde der Justus-Liebig Universität Gießen
- Interdisziplinäre Arbeitsgruppe Perinatologie/Neonatologie -

Betreuer: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt
Prof. Dr. L. Gortner

**Diagnose der bakteriellen Sepsis
des bovinen Neonaten durch Amplifizierung
bakterieller 16S-ribosomaler DNA mittels
Polymerasekettenreaktion**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Eingereicht von
Irene Noll
Tierärztin aus Mannheim
Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. L. Gortner

Tag der mündlichen Prüfung: 27.8.2003

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	SCHRIFTTUM	3
2.1	Sepsis	3
2.1.1	Humorale und zelluläre Mechanismen der Sepsis	5
2.1.2	Bakterielle Erreger der Sepsis des Kalbes	8
2.1.3	Diagnose der bakteriellen Sepsis in der Humanmedizin	11
2.1.4	Diagnose der bakteriellen Sepsis bei Kälbern	14
2.2	Hämatologische Messgrößen	17
2.2.1	Weißes Blutbild	17
2.2.2	Rotes Blutbild und Thrombozyten	22
2.2.3	Gesamtproteingehalt des Blutes	24
2.3	Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis bakterieller 16S-ribosomaler DNA	26
3	PROBANDEN UND METHODEN	32
3.1	Probandenkollektiv	32
3.1.1	Allgemeine Daten	32
3.1.2	Kontrolltiere	35
3.1.3	Erkrankte Tiere	36
3.1.4	Gruppeneinteilung	38
3.2	Methodik	39
3.2.1	Klinische Untersuchung	39
3.2.2	Blutprobenentnahme	40
3.2.2.1	Entnahmeintervalle	41
3.2.2.2	Blutprobenlagerung	41
3.2.3	Blutbildmessung	42
3.2.4	Bestimmung des Gesamtproteingehaltes	43
3.2.5	Blutkulturelle Untersuchung	44
3.2.6	Molekularbiologische Blutuntersuchung	45
3.2.6.1	Vorversuche	45

3.2.6.2	Hauptversuche	46
3.2.6.2.1	Plasmaextraktion	46
3.2.6.2.2	Leukozytenextraktion.....	47
3.2.6.2.3	Extraktion bakterieller DNA aus Leukozyten	47
3.2.6.2.4	Extraktion bakterieller DNA aus Plasma.....	48
3.2.7	Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
3.2.8	Optische Darstellung der PCR-Produkte	51
3.2.8.1	Agarosegelherstellung (2%ig)	51
3.2.8.2	Probenaufbereitung für die Agarosegelelektrophorese	51
3.2.8.3	Agarosegelelektrophorese	52
3.2.8.4	PCR-Kontrollproben	52
3.2.8.5	Kontaminationsverhütung.....	53
3.3	Statistische Auswertung	53
4	ERGEBNISSE	54
4.1	Optimierung der Lysispufferinkubationszeit	54
4.2	Sensitivitätsnachweis.....	56
4.2.1	Bestimmung der Keimkonzentration in der Bakterienstammlösung....	56
4.2.2	Sensitivität des Blutkultursystems.....	59
4.2.3	Sensitivität des Polymerasekettenreaktion-Nachweises.....	62
4.3	Kulturelle Blutuntersuchung	64
4.4	Molekularbiologische Blutuntersuchung	67
4.5	Klinische Daten und Befunde.....	69
4.5.1	Schicksal der Kälber	69
4.5.2	Altersverteilung	71
4.5.3	Geburtsumstände der Kälber.....	73
4.5.4	Kolostralversorgung der Kälber	74
4.5.5	Klinische Befunde	76
4.5.5.1	Pulsfrequenz	76
4.5.5.2	Atemfrequenz.....	78
4.5.5.3	Körperinnentemperatur	79
4.6	Labordiagnostische Befunde	81

4.6.1	Gesamtproteingehalt des Blutes	81
4.6.2	Leukozytengesamtzahl des Blutes	82
4.6.3	Hämatokrit	85
4.7	Methodenvergleich	87
4.7.1	Einfluss antibiotischer Behandlungen der Kälber auf das Ergebnis des Bakteriennachweises mittels PCR und Blutkultur	93
4.7.1.1	Überprüfung der Blutproben von Kälbern ohne vorherige antibiotische Behandlung	93
4.7.1.2	Überprüfung der Blutproben von Kälbern mit vorheriger antibiotischer Behandlung	95
4.7.2	Vergleich der klinisch erworbenen mit den labordiagnostisch ermittelten Befunden unter Berücksichtigung der Probenanzahl	97
4.7.2.1	Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis der ersten Blutkultur	98
4.7.2.2	Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis von zwei Blutkulturen	99
4.7.2.3	Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis eines PCR-Nachweises	100
4.7.2.4	Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis von zwei PCR-Nachweisen	101
4.7.3	Vergleich des Schicksals der Kälber mit den labordiagnostisch ermittelten Befunden unter Berücksichtigung der Probenanzahl	103
4.7.3.1	Retrospektive Auswertung der blutkulturellen Untersuchung unter alleiniger Berücksichtigung der ersten Blutprobe	103
4.7.3.2	Retrospektive Auswertung der blutkulturellen Untersuchung unter Berücksichtigung der ersten und zweiten Blutprobe	105
4.7.3.3	Retrospektive Auswertung des PCR-Nachweises unter alleiniger Berücksichtigung der ersten Blutprobe	107
4.7.3.4	Retrospektive Auswertung des PCR-Nachweises unter Berücksichtigung der ersten und zweiten Blutprobe	108
5	DISKUSSION	111

6	ZUSAMMENFASSUNG.....	123
7	SUMMARY	126
8	LITERATURVERZEICHNIS	128
9	ANHANG.....	141

Im Text verwendete Abkürzungen

Abb.	=	Abbildung
ACCP	=	American College of Chest Physicians
BAP	=	Blutagarplatte
bp	=	base pair
CARS	=	Compensatory Anti-inflammatory Reaction Syndrome
C	=	Celsius
CRP	=	C-reaktives Protein
CSF	=	Kolonie-Stimulierender-Faktor
DFV	=	Deutsches Fleckvieh
DIC	=	disseminierte intravasale Gerinnung
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
dGTP	=	Desoxyguanosintriphosphat
dATP	=	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	=	Desoxycytidintriphosphat
dNTP	=	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	=	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	=	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EHEC	=	enterohämorrhagische <i>Escherichia coli</i>
et al.	=	et alii

h	=	Stunden
Hb	=	Hämoglobin (<i>Haemoglobin</i>)
HSB	=	Holstein Schwarzbunt
HRB	=	Holstein Rotbunt
IgG	=	Immunglobulin G
IFN	=	Interferon
IL	=	Interleukin
KBE	=	Koloniebildende Einheit
KGH	=	Konservative Geburtshilfe
LPS	=	Lipopolysaccharid
l	=	Liter
MCP	=	Monocyte Chemoattractant Protein
MgCl	=	Magnesiumchlorid
min	=	Minute
mM	=	Millimolar
mmol	=	Millimol
MODS	=	Multiple Organ Dysfunction Syndrome
MOV	=	Multiorganversagen
n	=	Probenzahl
nb	=	nicht bestimmt

nz	=	nicht zählbar
PLT	=	Thrombozytenzahl (<i>Platelet Count</i>)
PCR	=	Polymerasekettenreaktion
PCT	=	Procalcitonin
RBC	=	Erythrozytenzahl (<i>Red Blood Cells</i>)
RBCLS	=	Red Blood Cell Lysis Solution
RCF	=	Relative Zentrifugalbeschleunigung
RNA	=	Ribonukleinsäure
rRNA	=	ribosomale Ribonukleinsäure
s	=	Standardabweichung
SCCM	=	Society of Critical Care Medicine
SIRS	=	Systemic Inflammatory Response Syndrome
TNF α	=	Tumornekrosefaktor α
TP	=	Gesamtprotein (<i>Total Protein</i>)
μ l	=	Mikroliter
WBC	=	Leukozytenzahl (<i>White Blood Cells</i>)
\bar{x}	=	Arithmetisches Mittel

1 EINLEITUNG

In der landwirtschaftlichen Nutztierhaltung sind die Verluste durch Jungtiererkrankungen, ungeachtet konstanter Weiterentwicklung des Aufzuchtmanagements und der medizinischen Versorgung, erheblich.

Neben den enteralen und pulmonalen Erkrankungen ist die Sepsis, als meist tödlich verlaufende Allgemeinerkrankung, eine der häufigsten Verlustursachen in der Kälberaufzucht (WALSER 1973; VIRTALA et al., 1996; DONOVAN et al., 1998). Da nach Auftreten erster Symptome bereits innerhalb von 12 Stunden der Tod eintreten kann, ist der unmittelbare Einsatz lebensrettender Notfallmaßnahmen und spezifischer Antiinfektiva unabdingbar (CONTREPOIS et al., 1986; FECTEAU et al., 1997 und 2001). Die zur Sicherung der klinischen Verdachtsdiagnose „Septikämie“ zur Verfügung stehenden Methoden sind bislang begrenzt. Als besonders problematisch erweist sich das Fehlen eines schnellen und verlässlichen labordiagnostischen Testverfahrens (ARONSON und BOR, 1987).

Die seit Mitte der 80er Jahre zunehmend in die moderne Diagnostik Einzug haltende Polymerasekettenreaktion (PCR) vermag einige der bestehenden Probleme zu lösen. So genügen einerseits bereits sehr geringe Keimmengen, um einen positiven Nachweis führen zu können, andererseits verkürzt sich der zeitliche Aufwand (zirka 6 Stunden) bis zum Vorliegen eines aussagekräftigen Ergebnisses erheblich. Zudem ist auch nach eingeleiteter antibiotischer Behandlung ein eventuell im Blut vorhandener Erreger nachweisbar, da die Polymerasekettenreaktion nicht auf das Vorhandensein von vermehrungsfähigen oder stoffwechselaktiven Erregern, sondern lediglich auf die Anwesenheit von Teilen der genetischen Information angewiesen ist (KANE et al., 1998).

In der humanmedizinischen Neonatologie sind die Grundlagen für diese Untersuchungsmethode bereits geschaffen. LAFORGIA und seine Arbeitsgruppe nutzten erstmals 1997 den Nachweis der 16S-rRNA durch sogenannte

Universalprimer zur Diagnose einer neonatalen Sepsis. Etwas später beschrieben CURSONS und SLEIGH mit Koautoren die Anwendung dieser Untersuchungsmethode bei erwachsenen Patienten (1999; 2000; 2001).

Ziel der hier vorgestellten Arbeit ist die Etablierung der Polymerasekettenreaktion zur Diagnose der bakteriellen Sepsis in der veterinärmedizinischen Neonatologie am Beispiel des Kalbes. So ist denkbar, dass die benötigte Zeit bis zum Vorliegen eines Untersuchungsergebnisses deutlich verkürzt und schnellstmöglich eine, dem Schweregrad der Erkrankung angemessene, Therapie eingeleitet werden kann.

Damit ließe sich auf der Basis des PCR-Resultates in derartigen Fällen eine ungezielte Verabreichung antiinfektiver Substanzen vermeiden, womit auch der gerade derzeit ständig zunehmenden bakteriellen Resistenzproblematik gegenüber vielen, vormals gut wirksamen, Antibiotika Rechnung getragen würde.

Des Weiteren sollen im Zuge dieser Arbeit die Vorzüge und Nachteile des Nachweises bakterieller DNA mittels PCR im Vergleich zur Blutkultur aufgezeigt werden.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Sepsis

Die klassische, auch heute noch häufig zitierte Definition der Sepsis geht auf den Mikrobiologen Hugo Schottmüller (1867-1936) zurück: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn von einem Herd aus konstant oder periodisch pathogene Keime in den Blutkreislauf gelangen und dadurch subjektive oder objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden. Demgegenüber finden sich bei einer Bakteriämie Bakterien im Blut, ohne dass es zu Krankheitserscheinungen kommt.“

Diese aus dem Jahre 1914 stammende Definition entspricht jedoch nicht mehr voll dem heutigen Stand der Forschung. So wurden Forderungen nach Weiterentwicklung der Definition in Anlehnung an die ständig wachsenden Erkenntnisse über die Pathogenese und Pathophysiologie postuliert. Zunehmende Bedeutung erlangten die endogen ausgeschütteten Mediatoren, so dass die Definition der Sepsis einerseits die mikrobiell-toxische, andererseits jedoch auch die systemische Entzündungsreaktion umfassen muss. Das Krankheitsbild der Sepsis wird ausgelöst, wenn grundsätzlich sinnvolle Abwehrreaktionen („host response“) nicht mehr durch die physiologischen Inhibitionsmechanismen des Körpers beherrschbar sind. Durch die entstehende generalisierte, überschießende Reaktion werden so nicht nur die auslösenden Noxen bekämpft, sondern auch körpereigene Zellsysteme und Organe, im Sinne eines *horror autotoxicus* (BAUE, 1992), schwer geschädigt.

Durch immer neue Einblicke in dieses komplexe Krankheitsgeschehen traten und treten zahlreiche Probleme zu Tage. Die uneinheitliche Erweiterung der Begriffe Sepsis, Septikämie und Sepsis-Syndrom führte zu epidemiologisch ungenauen Daten und widersprüchlichen Ergebnissen aus klinischen Studien. R.C. BONE, ein renommierter Forscher auf dem Gebiet der Sepsis, kritisierte diesen Zustand bereits vor Jahren und gab schließlich 1991 den Anstoß, eine einheitliche,

differenzierte Nomenklatur einzuführen. Dieser Ansatz wurde von der ACCP/SCCM (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine) in der Consensus Conference zur Findung einer einheitlichen Definition der Sepsis aufgegriffen (BONE et al., 1991; ACCP/SCCM, 1992; BONE et al., 1992).

Heute wird unter einer Sepsis die Summe lebensbedrohlicher Krankheitssymptome und pathophysiologischer Veränderungen verstanden. Ursächlich werden pathogene Keime und ihre Produkte, die aus einem Infektionsherd in die Blutstrombahn eindringen und durch die Bildung von endogenen Mediatoren (Zytokinen) die Entzündungskaskade aktivieren und zu einer nicht mehr kontrolliert ablaufenden systemischen Entzündungsreaktion führen, verantwortlich gemacht (GLAUSER et al., 1991; BEUTLER et al., 1993; ACCP/SCCM, 1992; BONE et al., 1997; FRANZ et al., 1999; FAUST et al., 2001).

Der mit dieser Entzündungsreaktion einhergehende Symptomkomplex wird als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet. Ist eine mikrobielle Infektion für diesen Symptomkomplex verantwortlich, wird dieser als Sepsis bezeichnet (ACCP/SCCM, 1992). SIRS kann auch als Folge eines primär nicht infektiösen Geschehens (zum Beispiel Verbrennungen, operative Eingriffe, Pankreatitis, Ischämie, Gewebsnekrosen) auftreten. SIRS und Sepsis können ein identisches Erscheinungsbild zeigen, unterscheiden sich jedoch durch die nachgewiesene, beziehungsweise nicht nachgewiesene Infektion. Treten im Zuge der Sepsis Organdysfunktionen auf, wird dieser Zustand als eine schwere Sepsis, mit zusätzlicher Hypotension als septischer Schock, bezeichnet. Das Auftreten schwerer Organdysfunktionen beim Akutkranken mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Intervention zur Aufrechterhaltung der Homöostase wird entsprechend den Richtlinien der ACCP/SCCM als Multiple Organ Dysfunktion Syndrome (MODS) (Multiorganversagen (MOV)) bezeichnet (ACCP/SCCM, 1992).

Die neonatale Sepsis des Säuglings wird in Abhängigkeit vom zeitlichen Auftreten zusätzlich in drei Verlaufsformen eingeteilt. Die Frühform („early onset“) tritt während der ersten Lebenstage auf. Haupterreger sind β -hämolisierende

Streptokokken der Gruppe B, gefolgt von *Staphylococcus intermedius* und *E. coli* (STOLL-BECKER et al., 2000). Die Infektion erfolgt perinatal in Folge einer bakteriellen Besiedlung des mütterlichen Vaginalbereiches. Die Spätform („late onset“) manifestiert sich überwiegend nach der ersten Lebenswoche. Ursächlich können hier, neben den Erregern der Frühform, Listerien und *Haemophilus influenza* genannt werden. Zu den typischen Erregern der nosokomialen Sepsis gehören *Klebsiella*, *Enterobacter* und *Pseudomonas Species* sowie *Staphylococcus epidermidis* oder *Candida*-Arten (REISS et al., 2000).

2.1.1 Humorale und zelluläre Mechanismen der Sepsis

Die Symptome der Infektion entstehen entweder durch den Erreger selbst, durch seine Stoffwechselprodukte oder durch die Aktivierung der Immunabwehr. Infolge einer bakteriellen Infektion werden im Organismus unterschiedlichste Mechanismen und Regelkreise aktiviert. Stand der heutigen Forschung ist, dass der Triggerung durch Zytokine die bedeutendste Rolle zukommt.

Zytokine sind Gewebshormone, die von einer Vielzahl von Zellen, insbesondere Immunzellen, produziert werden. Sie reagieren mit Rezeptoren von Zielzellen. Dort induzieren sie zum Teil sehr unterschiedliche Effekte. Allen gemein ist jedoch die wichtige regulatorische Funktion im Zuge immunologischer und inflammatorischer Prozesse (RACKOW et al., 1991; BURKE et al., 1993; BONE et al., 1997; RODRIGUEZ-GASPAR et al., 2001). Der in Folge einer Sepsis ausgelöste Symptomkomplex sowie das Multiorganversagen (MOV) werden heute als Folge einer komplexen und generalisierten Entzündungsreaktion interpretiert. Diese wird durch die Freisetzung von Zytokinen induziert und in Gang gehalten (GLAUSER et al., 1991; BEUTLER et al., 1993; BONE et al., 1997; RODRIGUEZ-GASPAR et al., 2001). Bis jetzt konnte allerdings noch kein spezifisches inflammatorisches Zytokin für den Beginn der Kaskade und somit als Ursache von SIRS identifiziert werden. Grundsätzlich ist die Zytokinausschüttung als gezielte

und physiologische Antwort auf eine Gewebeschädigung oder Infektion zu verstehen. Besonders hervorzuheben sind in diesem Zusammenhang die Entzündungszytokine Tumornekrosefaktor α (TNF α) sowie die Interleukine (IL) 1 und 6 (BONE et al., 1997; ROOS et al., 2000; TÖLLNER, 2002). IL 1 wird von aktivierten Makrophagen und zahlreichen anderen Zellen gebildet. Die Bildung wird insbesondere in Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen und durch die Gegenwart von bakteriellen Endotoxinen angeregt. Durch die Sezernierung von IL 1 werden T-Zellen zur Produktion und Sekretion von IL 2 aktiviert. In B-Zellen fördert es die Immunglobulinproduktion (OPPENHEIM, 1991). Weiterhin ist ein deutlicher, prokoagulanter Einfluss auf die Gerinnungsvorgänge im Körper unter Beteiligung von TNF α zu verzeichnen (BEUTLER et al., 1993; FAUST et al., 2001). Die IL 8-Synthese wird von IL 1 und TNF α stimuliert (BAGGLIONI, 1989). Des Weiteren werden von Monozyten und Makrophagen sowie Endothelzellen zum Teil erhebliche Mengen IL 6 gebildet. IL 6 ist der Hauptmediator für die Produktion von Akut-Phasen-Proteinen (KISHIMOTO et al., 1989).

Zytokine werden auch bei unterschiedlichen anderen, weniger dramatischen Krankheitsverläufen freigesetzt, ohne zwingend das Bild eines SIRS zu induzieren. Diese Beobachtung führte zu der Überlegung, dass die Freisetzung von Zytokinen nicht nur ein Wechselspiel proinflammatorischer Mediatoren darstellen kann. Je nach Abwehrlage muss ein entsprechendes antiinflammatorisches System bis zu einem gewissen Grad in der Lage sein, die Homöostase aufrecht zu erhalten (KASTNER et al., 2001). Die Summe dieser Gegenpolkräfte, die der Körper den akuten Entzündungsreaktionen entgegensetzt, wird als Compensatory Anti-inflammatory Reaction Syndrome (CARS) bezeichnet und bestimmt die Schwere der Erkrankung (BONE et al., 1997). Im Folgenden sind die pro- und antiinflammatorischen Moleküle in der Zusammenstellung nach BONE und Koautoren (1997) wiedergegeben.

Tabelle 1: Übersicht über pro- und antiinflammatorische Moleküle (nach BONE et al., 1997)

Proinflammatorische Moleküle		Antiinflammatorische Moleküle
TNF-alpha	Thromboxan	IL-1ra
IL-1beta	Platelet activating factor	IL-4
IL-2	Lösliche Adhäsionsmoleküle	IL-10
IL-6	Vasoaktive Neuropeptide	IL-13
IL-8	Phospholipase A2	Typ II IL-1-Rezeptor
IL-15	Tyrosinkinase	Transforming Growth Factor-beta
Neutrophile Elastase	Plasminogen activating inhibitor-1	Epinephrin
IFN-gamma	Freie Radikale	Löslicher TNF-alpha-Rezeptor
Proteinkinase	Neopterin	Leukotrien-B4-Rezeptor-Antagonist
MCP-1, MCP-2	CD14	Lösliches rekombinantes CD-14
Leukemia inhibitory factor	Prostacyclin, Prostaglandine	LPS-bindendes Protein

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Globulin, das bereits einige Stunden nach stattgefundenener Gewebeschädigung auftritt und durch Bindung an Bakterienoberflächen die Phagozytose derselben beschleunigt.

Des Weiteren wird im Rahmen einer Sepsis auch das Gerinnungssystem erheblich gestört (FAUST et al., 2001; GRINELL et al., 2001). Durch die Interaktion von Granulozyten und Gefäßendothel werden gleichermaßen Faktoren der Gerinnungskaskade und solche der Fibrinolyse freigesetzt. Imbalancen dieses sensiblen Systems können zu einer Verbrauchskoagulopathie und folglich zu einer disseminierten, intravasalen Gerinnung (DIC) mit mikrovaskulären Thrombosen führen. Die Folge ist eine unkontrollierte Kettenreaktion aus

Entzündung, Gerinnung und Fibrinolyse, die zu Ischämie, Hypoxie, Organdysfunktion und letztlich häufig zum Tod führt (KASTNER et al., 2001). Die entstehenden fibrinolytischen und antifibrinolytischen Faktoren werden zum Teil als prädiktive Marker diagnostisch genutzt.

2.1.2 Bakterielle Erreger der Sepsis des Kalbes

Bereits 1887 stellten UFFREDUZZI und JACCOUT fest, dass bei an einer Lungenentzündung erkrankten Kälbern nach unvollständiger Ausheilung des Prozesses eine Pyämie entsteht, welche zur Generalisation eines eitrigen Prozesses führt und den Tod zur Folge haben kann. Ursächlich für diese Erkrankung sahen sie vor allem *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus pneumoniae* an.

Im Zuge der kausalistischen Erforschung komplexer Krankheitsgeschehen und der erheblichen Verfeinerung labordiagnostischen Methoden sowie dem verstärkten Einsatz antiinfektiver Substanzen ist eine dynamische Änderung der qualitativen und quantitativen Gewichtung der einzelnen Bakterienarten zu verzeichnen. Nicht zuletzt variiert die prozentuale Verteilung der einzelnen Bakteriengattungen je nach dem der Untersuchung zugrunde liegenden Patientenkollektiv.

Als häufigster und somit bedeutungsvollster Erreger der Septikämie des Kalbes wird von BERCHTOLD und Koautoren (1990) *Escherichia coli* angegeben. Die *E.coli*-Sepsis tritt vor allem in der ersten Lebenswoche infolge einer Hypogammaglobulinämie auf (BALJER, 1985; STENGEL, 1998). Die vor allem als Zooantroponoseerreger bekannten und gefürchteten EHEC-Stämme, die beim Menschen zu schwerwiegenden, nicht selten tödlich endenden Erkrankungen führen, stehen bei den septischen Erkrankungen des Kalbes eher im Hintergrund (PIRRO et al. 1995; SOBJINSKI et al., 1996; BALJER et al., 1999).

Als Sepsisursache wird ätiopathogenetisch eine oronasale Infektion mit *E. coli* O78:K80(B), seltener auch O8, O9, O1, O55, O115, O117, aufgeführt. Das

plasmidkodierte Adhäsionsantigen CS 31A und F17c-Fimbrien werden speziell bei Septikämienstämmen gehäuft nachgewiesen (BERTIN et al., 2000). Der Verlauf einer solchen Infektion ist fast ausschließlich perakut und tödlich. Äußerst selten entsteht eine protrahierte Verlaufsform, in deren Folge metastatische Gelenks- und Sehnenscheidenentzündungen, Meningitiden und Meningoenzephalitiden auftreten.

Als häufigste Symptome gelten ein hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden, rezidivierende Fieberschübe (40-41°C), Inappetenz, eine erhöhte Puls- und Atemfrequenz, schmutzig-graue Konjunktiven, gefüllte Episkleralgefäße, zentralnervöse Störungen, eine Trübung der Augenkammern sowie das Absinken der Körpertemperatur. Im Verlauf der Erkrankung tritt meist nach 12-48 Stunden der Tod ein (SELBITZ, 2002).

Auch die Sepsis in Folge einer Pneumokokkose (*Streptococcus pneumoniae*-Infektion) verläuft meist perakut und tödlich (BERCHTOLD et al., 1990). In seltenen Fällen entsteht eine protrahierte Verlaufsform, die sich in Form einer Bronchopneumonie und Polyarthritiden darstellt. Anfällig für diese Erkrankung sind Jungtiere in den ersten sechs Lebenswochen. Häufigste Symptome sind Kreislaufstörungen, Zyanose und Dyspnoe in Folge der pulmonalen Affektion, Festliegen, zentralnervöse Störungen und Diarrhoe. Meist tritt selbst bei frühzeitiger Behandlung der Tod ein.

Die Salmonellose der Kälber kann ebenfalls einen septikämischen Verlauf nehmen. Die septikämische Form geht mit Fieber, Trinkschwäche, Hinfälligkeit, Apathie, Dyspnoe, zentralnervösen Störungen sowie einer Diarrhoe mit blutigen und fibrinösen Beimengungen einher. Der Tod tritt meist innerhalb von 1-2 Tagen, weniger häufig auch erst nach 6-10 Tagen ein.

Epidemiologisch handelt es sich häufig um Weideinfektionen mit *Salmonella typhimurium* und *Salmonella dublin*. Klinisch manifeste Infektionen treten in der Regel erst ab der 2. Lebenswoche auf und sind von einer hohen Letalität

gekennzeichnet. Mit zunehmendem Lebensalter entwickeln sich latente Infektionen.

1993 veröffentlichten ALDRIDGE und Mitarbeiter eine Untersuchung, in der 95 Kälber mit vermuteter Septikämie oder schwerwiegenden Erkrankungen mehrerer Organsysteme erfasst wurden. Diese Gruppe repräsentiert 7,4% der Gesamtheit der erkrankten Kälber. Bei 25 Tieren wurde *ante* oder *post mortem* die Diagnose Septikämie durch die kulturelle Untersuchung von Blut oder Organgewebe gestellt. Die blutkulturelle Untersuchung erbrachte in 7 Proben ein positives Ergebnis. *Escherichia coli* wurde in 4 der positiven Proben nachgewiesen. In einer Probe wurden Salmonellen und Clostridien in Mischkultur aufgefunden. Die verbleibenden zwei Proben enthielten je einmal *Hafnia Species* und Streptokokken.

Nach FECTEAU und Koautoren (1997) ist der mit Abstand häufigste Erreger der Septikämie des Kalbes mit einem Anteil von über 51% *Escherichia coli*, gefolgt von 25,5% weiteren gramnegativen Enterobakterien, 5,9% gramnegativen Anaerobiern, 11,7% grampositiven Kokken und 5,9% grampositiven Stäbchen. Das Alter der betroffenen Kälber betrug in der blutkulturnegativen Gruppe durchschnittlich 5,5 Tage und in der blutkulturpositiven Gruppe 7,5 Tage. Die Mortalitätsrate wurde in der blutkulturpositiven Gruppe mit 57,4% und in der blutkulturnegativen Gruppe mit 15,1% angegeben.

2001 veröffentlichte FECTEAU die Ergebnisse der Serotypbestimmung der in den Blutkulturen nachgewiesenen *E. coli* Serovaren. 24% der Isolate wurden als O78, weitere 12% als O119 typisiert. Die direkten Virulenzfaktoren F17c und CS31a wurden außerhalb der Serogruppen O78 und O119 nur selten nachgewiesen.

Diese Beobachtung entspricht der Feststellung von MAYR (2002), dass CS31a als plasmidkodiertes Adhäsionsantigen und F17c-Fimbrien speziell bei Septikämienstämmen des Serovar O78:K80(B) zu finden sind.

Des Weiteren liegen in der Literatur zahlreiche Einzelfallberichte über septikämische Erkrankungen beim Kalb vor. So beschrieb beispielsweise DEBEY

1996 mit seiner Arbeitsgruppe einen Sepsisfall in Verbindung mit *Actinobacillus suis*-ähnlichen Erregern. SEIMIYA und seine Gruppe berichteten 1992 über eine Sepsis infolge einer Listerieninfektion (*Listeria monocytogenes*) bei einem neun Tage alten Kalb. Die gleiche Arbeitsgruppe veröffentlichte im Folgejahr einen Fall einer septischen Meningitis in Zusammenhang mit einer *Klebsiella oxytoca*-Infektion. REBHUN publizierte bereits 1976 einen Fallbericht über *Erysipelothrix isidiosa*, KLUGE (1992) über *Erysipelothrix rhusiopathiae* als Sepsisursache. 1981 beschrieb die Gruppe um CECYRE einen Fall von *Salmonella choleraesuis* in Zusammenhang mit der Kälberseptikämie.

2.1.3 Diagnose der bakteriellen Sepsis in der Humanmedizin

Die Diagnose einer Sepsis ist in Anlehnung an die Empfehlungen der „Consensus Conference“ primär eine klinische Diagnose, welche durch laborchemische Veränderungen als Zeichen der systemischen Entzündungsreaktion (Leukozytose mit Linksverschiebung oder Leukopenie, eventuell auch Thrombopenie, Gerinnungsstörung, CRP-Anstieg) sowie das Ergebnis der blutkulturellen Untersuchungen unterstützt wird.

Verschiedene humanmedizinische Arbeitsgruppen haben sich mit der Entwicklung und der Überprüfung des prädiktiven Wertes von Scoringsystemen zur Sepsisdiagnose befasst. VAN NIEUWENHOVEN und Koautoren verglichen 1998 verschiedene Scoringsysteme um herauszufinden, welchen Einfluss diese auf die weitere Behandlung der Patienten haben. Sie stellten fest, dass die klinische Einstufung die Planung des Weiteren therapeutischen Regimes bestimmt. Darüber hinaus ist die Intention der Scoringsysteme, die genaue Einschätzung der Prognose des einzelnen Patienten zu ermöglichen. Ein weiteres Resultat dieser Kategorisierung ist die, wenn auch ethisch umstrittene, Einschätzung der Überlebenschance des einzelnen Patienten. Sie dient nicht zuletzt dazu, in aussichtslosen Fällen unnötige Leiden zu verhindern und, so befremdend

es aus Sicht der menschlichen Ethik klingen mag, die Behandlungskosten nicht unnötig in die Höhe zu treiben. Die klinische Relevanz dieser Scoringsysteme wird kontrovers diskutiert, da sie für die Einschätzung des aktuellen Zustandes des individuellen Patienten und seiner Risikofaktoren möglicherweise weniger geeignet erscheinen als für die indirekte Risikoabschätzung einer Patientengruppe und somit für die retrospektive Auswertung von klinischen Studien zur Beurteilung neuer therapeutischer Konzepte in der Behandlung von Hochrisikopatienten (BATES et al., 1997).

Im Zuge der Fortentwicklung labordiagnostischer Verfahren wurde vor allem in den letzten zwanzig Jahren eine Vielzahl diagnostischer Möglichkeiten für den Nachweis von Bakterien, Bakterienbestandteilen oder Stoffwechselprodukten entwickelt (FUNG et al., 1985). Ungeachtet dessen gilt nach wie vor die Blutkultur als „gold standard“ der Sepsisdiagnose, da diese bislang der einzige Test ist, der zur Ermittlung einer Bakteriämie standardisiert Anwendung findet (RELLER et al., 1982; ARONSON et al., 1987). Kaum eine Untersuchungsmethode ist jedoch so stark von der Wahl des Zeitpunktes, der Anzahl der Untersuchungen und der Technik der Probenentnahme abhängig, wie die Blutkultur (WASHINGTON et al., 1986).

Die Auswertung der Blutkultur benötigt zwei bis vier Tage bis zum Vorliegen eines Resultates (KURLAT et al., 1989). Das Auftreten falsch negativer Ergebnisse aufgrund einer nicht ausreichenden Erregermenge im Kulturmedium und das Auftreten falsch positiver Befunde durch eine Kontamination während der Blutentnahme stellen dabei ebenfalls ernst zu nehmende Unsicherheitsfaktoren dar (LAFORGIA et al., 1997; WICHELHAUS et al. 1999). Die durchschnittliche Kontaminationsrate wird in humanmedizinischen Arbeitsgruppen mit 1 bis 5,5% der Gesamtproben angegeben (WEINSTEIN et al., 1983; WILSON et al., 2000).

Eine differenziertere Betrachtung zur Einstufung der vermeintlichen Umweltkeime als Kontaminanden geben WILSON und Koautoren (1975), WEINSTEIN und Mitarbeiter (1983) sowie WICKELHAUS und seine Arbeitsgruppe (1999). Immunsupprimierte Patienten erkranken demzufolge häufiger an einer

nosokomialen Infektion, die nicht selten auch zur Sepsis führt. So stellte sich heraus, dass 21% der insgesamt isolierten *Corynebacterium Species* und 6% der insgesamt nachgewiesenen *Staphylococcus epidermidis* keine Kontamination, sondern die tatsächliche Sepsisursache darstellten (WEINSTEIN et al., 1983). Auch wird festgehalten, dass unterschieden werden muss zwischen Kontamination infolge einer nicht sterilen Probenentnahme und der Erfassung von Keimen in der Blutkultur, die aufgrund einer transienten Bakteriämie nur zufällig erfasst werden, jedoch keinen pathogenen Faktor darstellen.

WILSON und Mitarbeiter untersuchten 1975 Blut von 240 gesunden, erwachsenen Patienten und deckten dabei eine Kontaminationsrate von 2% auf. ARONSON und BOR (1987) merken dazu kritisch an, dass die Kontaminationsrate von Blutkulturen bei erkrankten Patienten höher liegt als bei gesunden Personen.

Bereits 1986 bewiesen WASHINGTON und ILSTRUP, dass die Kontaminationsrate bei Neonaten insgesamt deutlich höher liegt, ohne dabei auf die Ursache für diesen Umstand einzugehen. Diese Feststellung fand 1987 durch ARONSON und BOR Bestätigung.

Die Gruppe um WILSON (2000) verglich die Ergebnisse einer Multizenterstudie zum Einfluss der Hautdesinfektion auf die Kontaminationsrate. Blutkulturen von 12.367 erkrankten Personen wurden dazu ausgewertet. 6.362 Blutkulturen wurden nach Desinfektion mit jod- und alkoholgetränkten Tupfern, weitere 6.005 Proben nach Desinfektion mit Prep Kit II® (Desinfektionskompressen mit integrierten Brechampullen) entnommen. Die Kontaminationsrate der Blutkulturen betrug insgesamt 5,5% ohne signifikanten Unterschied zwischen den verwendeten Hautdesinfektionsmitteln.

1983 konnte WEINSTEIN in seiner Untersuchung aufzeigen, welche Bedeutung der wiederholten Blutprobenentnahme in der blutkulturellen Untersuchung zukommt. Mit nur einer Blutkultur konnten 91,5%, mit der zweiten 99,3% und mit der dritten Blutprobe 99,6% aller bakteriämischen Personen detektiert werden. Wissenschaftlich betrachtet wäre eine sichere Diagnosestellung nur durch eine

kontinuierliche Blutentnahme und eine simultane Erregerbestimmung im Blut über einen längeren Zeitraum möglich. Daher folgern ARONSON und BOR (1987), dass es letztlich keinen unabhängigen „gold standard“ gibt, die Blutkultur jedoch in Ermangelung verwertbarer Alternativen der einzige gebräuchliche Test zur Bestimmung einer Bakteriämie ist.

Neuere Erkenntnisse über die Pathogenese systemischer Infektionen haben dazu geführt, dass zunehmend pro- und antiinflammatorische Parameter zur Diagnose und Verlaufsbeurteilung der Sepsis herangezogen werden (PAHLKE et al., 1997; COHEN et al., 1999). Bei an einer Sepsis erkrankten Neonaten kann durch eine wiederholte Messung von IL 8 und CRP der Behandlungserfolg verifiziert werden (EHL et al., 1997; FRANZ et al., 1999).

Ein weiterer Hoffnungsträger in der Sepsisdiagnostik ist Procalcitonin (PCT). Dieses Propeptid des Calcitonins wird beim Gesunden in den C-Zellen der Schilddrüse synthetisiert und im Anschluss proteolytisch gespalten, so dass diese Vorstufe unter physiologischen Bedingungen nur in äußerst niedrigen Konzentrationen im Blut nachweisbar ist. Bei systemisch manifestierten Infektionen treten PCT-Werte von bis zu 100 ng/ml auf. Schon ein Anstieg des Procalcitonins auf über 2 ng/ml wird als Hinweis auf eine Infektion gewertet. Werte über 3 ng/ml sichern die Diagnose einer Sepsis mit einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 48% (PAHLKE et al., 1997). Der Syntheseort dieses Procalcitonins ist bisher unbekannt, sicher ist jedoch, dass auch ein starker Anstieg der PCT-Werte keine Erhöhung des Serumcalcitoninspiegels und keine Steigerung der Calcitoninaktivität zur Folge hat (PAHLKE et al., 1997).

2.1.4 Diagnose der bakteriellen Sepsis bei Kälbern

Obwohl die Sepsis in der veterinärmedizinischen Neonatologie eine große Rolle spielt, wird die Blutkultur kaum zur Sicherung der klinischen Verdachtsdiagnose herangezogen. Dies hat mehrere Gründe. Zum Einen verläuft eine Sepsis meist akut, so dass aus Zeitgründen auf eine Erregerbestimmung verzichtet und die

begonnene antibiotische Therapie bei nicht eintretender Besserung umgestellt wird. Zum Anderen ist unter Praxisbedingungen eine sterile Blutentnahme nicht immer möglich. Nicht zuletzt muss auch die Kostenbelastung für den Tierbesitzer Berücksichtigung finden.

Die Problematik der Bestimmung des richtigen Zeitpunktes der Blutentnahme und die hohe Anzahl der notwendigen Kulturen sind weitere Faktoren, die die Blutkultur im veterinärmedizinischen Sektor an Attraktivität einbüßen lassen. Da verschiedene Blutkultursysteme kommerziell erhältlich sind, seien die gebräuchlichsten daher im Folgenden kurz erläutert.

Die einfachsten Systeme bestehen ausschließlich aus einer Nährbouillon. Biphasische Systeme (zum Beispiel Septi-Check[®], Becton Dickinson) enthalten zusätzlich einen festen Nährboden. Durch einfaches Kippen der Flasche erfolgt die Subkultivierung.

Das in der vorliegenden Studie verwendete SIGNAL-Blutkultursystem BC 100 (Oxoid, Wesel) wurde 1986 von SAWHNEY und Mitarbeitern entwickelt. Es arbeitet mit einer manometrischen Kohlendioxidbestimmung als Indikator für Stoffwechselfvorgänge und damit für mikrobielles Wachstum. Mit diesem System kann sowohl aerobes, anaerobes als auch mikroaerophiles Wachstum detektiert werden.

Um die bakterizide Aktivität des Serums sowie antimikrobieller Substanzen im Blut zu neutralisieren, enthalten die Blutkulturmedien neben der Nährbouillon und zahlreichen anderen Zusätzen, polyanionische Antikoagulanzen (Natriumpolyabethylsulfonat). Diese unterbinden die Komplementreaktion, hemmen die Lysozym-Aktivität und inhibieren die Phagozytose. Auch antibiotische Wirkstoffe der Aminoglykosid- und Polymyxingruppe werden inaktiviert.

In einer umfassenden Studie veröffentlichten FECTEAU und Koautoren (1997) ihre Ergebnisse und Erfahrungen bezüglich des Anlegens und der Auswertung von Blutkulturen bei schwerwiegend erkrankten Kälbern. Insgesamt wurden dabei 378 Blutkulturen von 190 Kälbern ausgewertet. Ein Kalb wurde dann als

septikämisch eingestuft, wenn in mindestens einer der zwei Kulturen ein pathogener Keim nachweisbar war. Haut- und Umweltkeime, hier *Bacillus Species* sowie nicht klassifizierte grampositive und gramnegative Stäbchen wurden als Kontaminanden angesehen. Die Autoren geben eine Kontaminationsrate von 1,3% an. Die bakteriologischen Befunde dieser Untersuchung wurden im Kapitel 2.1.2 besprochen.

Zweites Standbein des Sepsisdiagnose sind die Scoringsysteme. Die Gruppe um FECTEAU entwickelte 1997 den klinischen Sepsis-Score für Kälber, der eine schnelle und zuverlässige Beurteilung des Gesundheitszustandes ermöglichen soll. In diesem Beurteilungssystem wurden folgende Parameter berücksichtigt: die Kotbeschaffenheit, der Hydratationsstatus, das Allgemeinbefinden, die Zahl und Größe der Episkleralgefäße sowie die Nabelsituation. Ebenfalls gingen das Lebensalter und das Vorhandensein fokaler Entzündungsherde in die Beurteilung mit ein.

LOFSTEDT und Mitarbeiter wiesen 1999 in ihrer Studie nach, dass 31% der Durchfallerkrankungen einen septischen Verlauf nehmen. Als Referenzmethode zur Spezifizierung einer vorliegenden Sepsis wurden die bakteriologischen Untersuchungsbefunde des Blutes sowie, in Fällen einer Polyarthrit, die der Synovia herangezogen. Bei verendeten oder getöteten Kälbern waren die pathologischen Sektionsbefunde ausschlaggebend. Retrospektiv entwarfen die Autoren zwei verschiedene Modelle zur Diagnose einer Septikämie. Das erste Modell basiert auf den Daten der klinischen Untersuchung. Folgende Kriterien fanden dabei Berücksichtigung: das Alter, das Vorhandensein lokaler Infektionsherde sowie das Stehvermögen und die Stärke des Saugreflexes.

Das zweite Modell legt den Schwerpunkt auf die Beurteilung labordiagnostischer Parameter. Der Serumkreatiningehalt, der Anteil toxischer neutrophiler Granulozyten und der Immunglobulingehalt des Blutes werden dazu bewertet. Zusätzlich gehen die klinischen Parameter Saugreflex und das Vorhandensein lokaler Infektionsherde in die Bewertung mit ein.

Durch die Kombination beider Modelle konnte bei über 90% der an einer Diarrhoe, nicht aber an einer Sepsis erkrankten Kälber eine Sepsis ausgeschlossen werden. Bei 40% der septikämisch erkrankten Kälber wurde eine korrekte Aussage über das Vorliegen dieser Erkrankung getroffen.

Die Beurteilung des weißen und roten Blutbildes liefert ergänzend zu der klinischen Untersuchung und dem bakteriologischen Ergebnis der Blutkultur wertvolle Daten zur Beurteilung des Infektionsstatus.

Die in der Humanmedizin durchführbare Bestimmung von CRP und IL8 zur Sepsisdiagnose und zur Verifizierung des Behandlungserfolges (EHL et al., 1997; FRANZ et al., 1999) steht nicht als diagnostische Option für den bovinen Neonaten zur Verfügung, da das CRP beim Kalb als Frühphasenprotein im Zuge inflammatorischer Prozesse nicht pathognostisch ist (JAIN, 2001).

2.2 Hämatologische Messgrößen

Die Beurteilung des weißen und roten Blutbildes liefert ergänzend zu dem bakteriologischen Ergebnis der Blutkultur wertvolle Daten zur Beurteilung des Infektionsstatus. Im Folgenden sei daher ein kurzer Überblick gegeben.

2.2.1 Weißes Blutbild

Die weißen Blutzellen stellen eine uneinheitliche Zellpopulation dar, die in Granulozyten (neutrophile, eosinophile, basophile) und mononukleäre Zellen (Lymphozyten, Monozyten) eingeteilt wird.

Die Leukozyten sind amöboid bewegliche Zellen, deren Hauptfunktion darin besteht, durch Pinozytose und Phagozytose körperfremde oder körpereigene,

unbrauchbar gewordene Stoffe aufzunehmen, zu vernichten und abzutransportieren. Das Blutplasma dient hierbei als Transportmedium von der Bildungsstelle zum Einsatzort.

Die Blutanalyse stellt bezüglich der Art und Anzahl der Leukozyten die Momentaufnahme eines dynamischen Prozesses dar. Zum Einen wird die aktuelle Reaktionslage des Körpers, zum Anderen aber auch der Umstand der Probenentnahme wiedergegeben. An der Gefäßwand anheftende neutrophile Granulozyten können beispielsweise durch eine Erhöhung des Blutdruckes in Folge der Stresseinwirkung im Zuge der Probenentnahme in den axialen Blutstrom geraten und so zu einer Erhöhung der Messwerte beitragen (EDER, 1987; KRAFT et al., 1997; JAIN, 2001).

Die Leukozytenzahl WBC (White Blood-Cell Count) unterliegt beträchtlichen sowohl individuellen als auch spezies- und altersspezifischen Schwankungen. Die Regulation der Leukozytenzahl folgt neben der Einflussnahme durch Zytokine (Interleukine (IL), Kolonie-Stimulierende-Faktoren (CSF), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF) und Interferone (IFN) überwiegend vegetativ-nervalen Regulationsmechanismen.

Zu den physiologischen Einflussfaktoren zählen unter anderem die Nahrungsaufnahme, körperliche Arbeit, Aufregung, eine fremde Umgebung sowie tageszeitlich bedingte Veränderungen (KRAFT et al., 1997; JAIN, 2001).

Sinkt der WBC unter 5×10^9 G/l Leukozyten, wird beim Rind von einer Leukopenie gesprochen. Dies deutet auf eine akute Belastung des Organismus durch ein Intoxikations- oder Infektionsgeschehen hin. Ein solcher Zustand bleibt meist nur wenige Stunden bis Tage bestehen, um dann in eine Leukozytose überzugehen. Geschieht dies nicht, ist die Prognose ungünstig.

Septisch erkrankte Kälber entwickeln nach Untersuchungsergebnissen von TENNANT und Koautoren (1975) signifikant häufiger eine Leukopenie als jene mit einer organbegrenzten Enteritis. Ursächlich dafür ist die lokale Begrenzung der Entzündung im Vergleich zu einer Sepsis zu sehen. Bereits fünf Minuten nach

einer intravenösen Gabe von Endotoxinen konnte experimentell eine Leukopenie ausgelöst werden. Diese blieb bis zum Tod der Tiere bestehen. Jene Kälber, die länger als zwölf Stunden überlebten, entwickelten 24 Stunden nach Endotoxingabe eine Leukozytose (TENNANT et al., 1975).

Die einzelnen Leukozytenarten haben unterschiedliche Funktionen. Deshalb bietet eine genaue Differenzierung der Zellpopulationen eine bessere Beurteilungsmöglichkeit der Erkrankungsursache. Die Aufschlüsselung der Leukozytenarten erfolgt in den relativen Anteil in Prozent und den absoluten Anteil in Zellen $\times 10^9/l$ bzw. Zellen/ μl . Die Aussagekraft der absoluten Zahlenwerte steht dabei im Vordergrund (EDER, 1987; KRAFT et al., 1997; JAIN 2001).

Die Funktion der zur gerichteten Lokomotion und Migration fähigen neutrophilen Granulozyten besteht hauptsächlich in der Phagozytose. Sie repräsentieren einen wesentlichen Bestandteil der unspezifischen Abwehr im Zuge einer beginnenden bakteriellen Infektion und Intoxikation. Nach einer Verweildauer in der Blutbahn von wenigen Minuten bis zu 14 Stunden wandern sie an ihren eigentlichen Wirkungsort, in das Gewebe. Dort verbleiben sie nach Erfüllung ihrer Aufgabe bis zum Abbau (JAIN, 2001).

Die durch physiologische und pathologische Stimuli (Furcht, Stress) sezernierten Substanzen Epinephrin und Kortikosteroide haben eine Entleerung des marginalen Pools der neutrophilen Granulozyten zur Folge und können so innerhalb kurzer Zeit zu einer Neutrophilie führen (JOYCE et al., 1976). Neutropenien entstehen bei erhöhtem Verbrauch, bei Bildungsstörungen und durch eine Verschiebung von neutrophilen Granulozyten aus dem strömenden Blut in den marginalen Pool. Mögliche Ursachen sind virale Infektionskrankheiten, Schock, toxische Noxen oder eine Knochenmarksschädigung (KRAFT et al., 1997; BLEUL, 1998; JAIN, 2001; BLEUL et al., 2002).

Die basophilen Granulozyten sind die seltenste Zellart im Blutbild des Rindes. Die Hauptaufgabe dieser Zellgruppe beruht auf der Induktion eines Entzündungsgeschehens. Durch Degranulation werden vasoaktive Substanzen

und leukozytenstimulierende Mediatoren freigesetzt, in deren Folge neutrophile und eosinophile Granulozyten in das entzündete Gewebe einwandern (EDER, 1987; JAIN, 2001).

Die eosinophilen Granulozyten sind relativ große (12-13 μm), bewegliche und zur Phagozytose fähige Zellen. Im Blut sind vergleichsweise wenig Eosinophile, während eine große Anzahl in den Speichern des Knochenmarks und der Milz lagert, um bei Bedarf rasch mobilisiert werden zu können. In der Regel wandern die eosinophilen Granulozyten nach sechs bis acht Stunden aus der Blutbahn ins Gewebe ab. Als chemotaktische Substanzen wirken neben Antigen-Antikörperkomplexen, besonders unter Beteiligung von IgE, Mastzellprodukte, Arachidonsäuremetaboliten und aktivierte Komplement-Komponenten sowie Leukotriene (EDER, 1987; JAIN, 2001).

Eine Eosinophilie ist als Folge einer gesteigerten Produktion und einer vermehrten Ausschüttung der Zellen aus dem Knochenmark zu sehen. Vorübergehend kann dieser Effekt durch eine Adrenalinausschüttung ausgelöst werden. Die phagozytotische und bakterizide Aktivität der Eosinophilen ist deutlich geringer als jene der neutrophilen Granulozyten, jedoch übernehmen sie eine entscheidende Rolle in der Infektionsabwehr von Parasiten (EDER, 1987).

BOSTEDT und BERCHTOLD fanden bereits 1968 einen Zusammenhang zwischen einer partiellen Nebenniereninsuffizienz infolge eines Erschöpfungszustandes nach extremen Stress-Situationen (Schwergewurt) und einer daraus resultierenden Eosinopenie (BOSTEDT et al., 1968).

Die Lymphozyten haben eine zentrale Aufgabe im zellulären und humoralen Geschehen der Infektionsabwehr. Die T-Lymphozyten repräsentieren die zelluläre, während die B-Lymphozyten/ Plasmazellen die humorale Immunreaktion darstellen (EDER, 1987; JAIN, 2001).

Eine Lymphozytose kann durch forcierte Zirkulation von Blut und Lymphe, als Folge des Epinephrin-Effektes, auftreten. Des Weiteren entsteht im Zuge der Heilungsphase einer Infektionskrankheit, sowie bei chronischen bakteriellen oder

viralen Infektionskrankheiten und bei Endotoxämien eine Lymphozytose (KRAFT 1997, JAIN 2001). Kortikosteroide hingegen führen durch einen erhöhten Übertritt der Zellen aus dem Blut in die Speicherorgane Milz, Knochenmark und Lymphknoten zu einer Lymphopenie (THUN et al., 1994).

Die sehr beweglichen und mit Pseudopodien ausgestatteten Monozyten bilden zusammen mit den Lymphozyten das sogenannte „mononukleäre Phagozytensystem“ (MPS).

Ins Gewebe abwandernde Monozyten entwickeln sich zu Makrophagen (EDER, 1987; JAIN, 2001). Monozyten besitzen eine ausgeprägte Phagozytose- und Pinozytosefähigkeit. Bei der Immunreaktion spielen die Makrophagen als Antigenpräsentatoren eine zentrale Rolle.

Die diagnostische Bedeutung der Monozyten besteht in einer bei subakuten und chronischen Entzündungen auftretenden Monozytose (KRAFT et al., 1997; JAIN, 2001).

MORITZ ermittelte 2000 die im Folgenden dargestellten, altersunabhängigen Referenzwerte des bovinen weißen Blutbildes.

Tabelle 2: Altersunabhängige Referenzwerte des bovinen weißen Blutbildes (nach MORITZ, 2000)

Parameter/Einheit	Referenzwerte
WBC G/l	5,6-14,3
neutrophile Granulozyten G/l	1,19-6,40
eosinophile Granulozyten G/l	0,04-1,52
basophile Granulozyten G/l	0,03-0,23
Lymphozyten G/l	2,72-8,75
Monozyten G/l	0,18-0,88

Da jedoch erhebliche quantitative Unterschiede in den einzelnen Zellpopulationen

in Vergleich zum neonatalen Kalb auftreten können, seien hier gesonderte Referenzwerte genannt (ADAMS et al., 1992).

Tabelle 3: Altersabhängige Referenzwerte ($\bar{x} \pm s$, nach ADAMS et al., 1992)

Parameter/Einheit		1. Tag	2. Tag	21. Tag
WBC G/l	\bar{x}	9,81	7,76	8,65
	$\pm s$	2,8	1,95	1,69
neutrophile Granulozyten G/l	\bar{x}	6,48	4,11	2,92
	$\pm s$	2,66	2,04	1,14
Lymphozyten G/l	\bar{x}	2,73	2,85	5,05
	$\pm s$	0,82	0,88	0,8
Monozyten G/l	\bar{x}	0,23	0,35	0,62
	$\pm s$	0,21	0,28	0,33
eosinophile Granulozyten G/l	\bar{x}	0,02	0,02	0,02
	$\pm s$	0,04	0,03	0,04
basophile Granulozyten G/L	\bar{x}	0	0	0
	$\pm s$	0	0	0

2.2.2 Rotes Blutbild und Thrombozyten

Die Erythrozyten erfüllen hauptsächlich Transportfunktionen. Sie befördern Sauerstoff von der Lunge ins Gewebe und Kohlensäure in umgekehrter Richtung. Aus diesem Zusammenhang ergibt sich auch ihre Funktion in der Regulation des pH-Wertes (EDER, 1987).

Anämische Zustände sind häufig ursächlich oder begleitend zu anderen Erkrankungen zu beobachten. In diesem Zusammenhang sei vor allem auf die Eisenmangelanämie der Kälber hingewiesen, die kongenital bereits angelegt und, in ihrer larvierten Form, zu einem späteren Zeitpunkt klinisch manifest werden kann. Durch eine daraus resultierende Mangeloxygenierung des Gewebes kann eine erhebliche Beeinträchtigung der unspezifischen Abwehr erfolgen, welche für die betroffenen Kälber ein erhöhtes Infektionsrisiko bedeutet (BOSTEDT et

al.,1990). Die Erythrozyten- und Hämoglobinwerte können auch unter physiologischen Bedingungen, in Abhängigkeit vom Reproduktionsstatus, gewissen Schwankungen unterworfen sein. So zeigen beispielsweise Kühe in der Gestationsperiode eine Verminderung der Erythrozytenzahl, die, den Autoren zufolge, nicht zwangsläufig auf eine absolute Verminderung der Anzahl, sondern vielmehr auf eine übermäßige Zunahme des Plasmavolumens zurückzuführen ist (BOSTEDT et al., 1974).

KRAFT und Koautoren (1997) definierten die Anämie als eine Verminderung der Zahl und/oder Masse der Erythrozyten, des Hämoglobingehaltes in seiner Gesamtheit oder der einzelnen Erythrozyten oder der O₂-Transportkapazität der Erythrozyten. Die Klassifizierung der verschiedenen Anämieformen basiert auf dem Grad der Hämolyse (hämolytische und nicht-hämolytische Anämie), der erythropoetischen Reaktivität des Knochenmarks (regenerative und nicht-regenerative Anämie) und der Erythrozytenmorphologie (Zellgröße, Zellform), sowie den jeweils auslösenden Pathogenitätsmechanismen.

Thrombozyten sind kernlose Zellabschnürungen der im Knochenmark ansässigen Megakaryozyten. Mit einem Durchmesser von 2-3,5 µm stellen sie die kleinste Zellgruppe des Blutes dar. Tritt durch eine Gefäßverletzungen Blut aus, bilden sie tentakelähnliche Protoplasmaausläufer, die durch Zerfall und Agglutination einen wichtigen Bestandteil der Blutgerinnung darstellen (EDER, 1987).

Thrombozytosen treten nach Operationen, Blutverlusten und Splenektomien auf. Thrombozytopenien können in Folge einer disseminierten intravasalen Gerinnung und bei Knochenmarksdepressionen, durch Medikamente oder ionisierende Strahlung auftreten (KRAFT et al., 1997).

In der folgenden Tabelle sind die durch MORITZ (2000) evaluierten altersunabhängigen Referenzwerte, beschränkt auf die für diese Untersuchung bedeutsamen Parameter, dargestellt.

Tabelle 4: Altersunabhängige Referenzwerte des bovinen roten Blutbildes (nach MORITZ, 2000)

Parameter/Einheit	Referenzwerte
RBC T/l	5,37-14,3
HGB mmol/l	4,73-8,85
HTC l/l	0,21-0,37
PLT G/l	154-1022

Eine Altersabhängigkeit der Referenzwerte des bovinen Blutbildes wird von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben. Im Folgenden sind die altersabhängigen Referenzwerte nach ADAMS et al. (1992) aufgeführt.

Tabelle 5: Altersabhängige Referenzwerte ($\bar{x} \pm s$, nach ADAMS et al., 1992)

Parameter/Einheit		1 Tag	2 Tage	21 Tage
RBC T/l	\bar{x}	8,17	7,72	8,86
	$\pm s$	1,34	1,09	0,68
HGB g/dl	\bar{x}	10,9	10,5	11,3
	$\pm s$	2,05	1,8	1,02
HTC l/l	\bar{x}	0,34	0,32	0,35
	$\pm s$	0,06	0,06	0,03

2.2.3 Gesamtproteingehalt des Blutes

Im Blutplasma von Mensch und Tier sind insgesamt über 200 unterschiedliche Proteine anzutreffen. Ein Teil dieser Proteine zeigt bei verschiedenen Erkrankungen pathognostische Veränderungen. Jedoch sind die Konzentrationen der verschiedenen Fraktionen bereits unter physiologischen Bedingungen von einer Vielzahl unterschiedlicher Faktoren abhängig, so zum Beispiel dem Lebensalter und dem Ernährungszustand des Tieres. Die Plasmaproteine

stammen hauptsächlich aus der Leber und den Zellen des mononukleären Phagozytensystems (MPS), welches durch Lymphgewebe und Plasmazellen repräsentiert wird. Allgemein enthält das Plasma 50 bis 70 g/l Protein (KANEKO, 1989). Wichtigste Bestandteile sind das Albumin und die verschiedenen Globulinfraktionen. Die histologische Beschaffenheit der Wiederkäuerplazenta (*Placenta epitheliochorialis cotyledonaria*) verhindert zwar eine transplazentäre Passage von Immunglobulinen, trotzdem sind im Blutplasma von Kälbern bereits vor der ersten Kolostrumaufnahme geringe Mengen an Gammaglobulinen nachweisbar (MOLLA, 1978; BANKS, 1982; ZAREMBA et al., 1985; STENGEL, 1998). Erste IgG-tragende Zellen wurden von BANKS (1982) bereits 135 Tage *post conceptionem* nachgewiesen. Diese stellen also eine Eigensyntheseleistung des *Fetus* dar. Erst mit der Kolostrumaufnahme in den ersten Lebensstunden und -tagen steigt der Gesamtproteingehalt durch eine relative Verminderung des Albumingehaltes sowie einer relativen Erhöhung der Globulinwerte (STENGEL, 1998). Diese können beim Kalb Konzentrationen von 10-15 g/l Plasma erreichen. Bei Betrachtung des mittleren Gesamtproteingehaltes des Blutes mit einem Wert von 45-70 g/l wird deutlich, dass sowohl eine gute als auch eine ausbleibende Absorption von Gammaglobulinen eine deutliche Änderung des Gesamtproteingehaltes zu bewirken vermag (DONOVAN et al., 1998). In der Literatur werden bezüglich Prädiktivität des Gesamtproteingehaltes unterschiedliche Aussagen vertreten.

1996 arbeiteten REA und Koautoren an einer Methode zur Voraussage der Kälbersterblichkeit. Dazu verglichen sie die Aussagekraft verschiedener Verfahren zur Bestimmung des passiven Transfers von kolostralen Antikörpern. Die Autoren kommen zu der Überzeugung, dass weder durch die Bestimmung von IgG noch durch die Messung des Gesamtproteingehaltes des Blutes oder durch die Aussage eines Zinksulfattrübungstestes eine signifikante Aussage über das Schicksal des Kalbes getroffen werden kann. Die größte relative Mortalität lag jedoch bei Kälbern mit einem Gesamtproteingehalt unter 4,5 g/dl, einer IgG Konzentration von weniger als 500 mg/dl und einem einfach positiven Ausgang des Zinksulfattrübungstestes vor.

Entgegen dieser Aussagen fand DONOVAN (1998), dass zwischen dem Gesamtproteingehalt im Blutplasma und dem Vorliegen einer Septikämie eine lineare, negative Korrelation besteht.

In einer anderen Studie untersuchten bereits 1975 TENNANT und sein Team die Auswirkungen einer, durch gramnegative Organismen hervorgerufenen, Diarrhoe und Septikämie auf die hämatologischen Parameter des neonatalen Kalbes. Dabei zeigte sich, dass der Gesamtproteingehalt des Blutes bei Kälbern mit Sepsis signifikant niedriger war, als bei Tieren mit einer primären Enteritis. Dieser Zusammenhang wird durch das Fehlen von Immunglobulinen erklärt.

In der folgenden Tabelle sind die Normwerte für verschiedene Altersgruppen angegeben.

Tabelle 6: Altersabhängige Referenzwerte ($\bar{x} \pm s$) für den Gesamtproteingehalt (TP in g/dl, nach ADAMS et al., 1992)

Parameter/Einheit		1. Tag	2. Tag	21. Tag
TP g/dl	\bar{x}	6,4	6,4	6,4
	$\pm s$	0,7	0,7	0,3

2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) zum Nachweis bakterieller 16S-ribosomaler DNA

Die PCR stellt eine *in vitro*-Methode zur spezifischen Synthese von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Fragmenten dar. Dazu werden synthetisch hergestellte DNA-Sequenzen, die sogenannten Oligonukleotidprimer, dem DNA-Isolat beigefügt. Diese binden an die einzelsträngigen Randregionen der Ziel-DNA des jeweils gegenüberliegenden Stranges. Die Polymerase synthetisiert Einzelstränge, die vom 3´OH-Ende jedes Primers ausgehen. Dieser Vorgang wird erst durch den Zusatz der vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dGTP, dCTP und dTTP (dNTP´s), des Oligonukleotidprimerpaares, der Reaktionspuffer und der Polymerase ermöglicht. Der gesamte Zyklus lässt sich durch Denaturierung der Präparation und einen neuen Reaktionsstart wiederholen. Die PCR besteht also aus drei Reaktionsschritten, die gemeinsam einen Zyklus darstellen.

Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die DNA-Doppelstränge durch Erhitzung in Einzelstränge aufgebrochen. Im zweiten Schritt, dem Annealing, binden die Oligonukleotidprimer an die komplementären DNA-Stänge. Im dritten und letzten Reaktionsschritt findet die DNA-Neusynthese statt. Die Verlängerung eines DNA-Einzelstranges erfolgt vom 5´-Ende zum 3´-Ende. Die neu synthetisierten DNA-Stränge dienen wiederum als Matrize und tragen so dazu bei, dass mit jedem neuen Zyklus die Konzentration der vervielfältigten Sequenzen theoretisch exponentiell ansteigt. Tatsächlich wird die Ausbeute mit steigender Zykluszahl durch sinkende Enzymaktivität jedoch abgeschwächt, so dass nach Erreichen einer Plateauphase die Konzentration der Zielsequenz linear zunimmt (MULLIS et al., 1986 ; LEWIN, 1998).

Seit der Entwicklung der PCR 1983 durch Mullis (MULLIS et al., 1986 und 1987; MULLIS, 1990) hat sich diese zu einer der wichtigsten Methoden in der Labordiagnostik und Forschung entwickelt. Sie findet ebenso wie in der Biochemie, der Gentechnologie und der Molekularbiologie in der Medizin und

Veterinärmedizin zunehmende Anwendung. Für die Erfindung der PCR wurde Mullis 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet.

Das bakterielle Ribosom ist als Ort der Proteinbiosynthese sowohl funktionell als auch strukturell ein wesentlicher Bestandteil der Bakterienzelle. Jedes *E.coli*-Bakterium enthält etwa 15.000 Ribosomen, die zu 65% aus ribosomaler Ribonukleinsäure (rRNA) und zu 35% aus Proteinen bestehen und so etwa ein Viertel der Trockensubstanz der Bakterienzelle darstellen (WOESE, 1987; LEHNINGER, 1998, LEWIN, 1998).

Die Sedimentationskoeffizienten biologischer Makromoleküle werden in Svedbergeinheiten (S) ausgedrückt. Prokaryotische Ribosomen sind 70S-Partikel, die aus einer 50S- und einer 30S-Untereinheit bestehen. Die große Untereinheit enthält 23S- und 5S-rRNA. Die kleine Untereinheit enthält 16S-rRNA (LEHNINGER, 1998; LEWIN 1998).

Der phylogenetische Stammbaum der Bakterien hat die ribosomale RNA zur Grundlage. Besonders die hochkonservierten Bereiche der 16S- und 23S-rRNA dienen als phylogenetische Chronometer (WOESE, 1987 und 1990; TANNER et al., 1994; AMANN et al., 1995; WOESE, 2002).

Die bakterielle rRNA wird in der Bakterienzelle von mehreren Genen codiert. Diese rRNA-Gene werden verschiedentlich auch als rDNA bezeichnet (AMANN, 1995; LEWIN, 1998; CURSONS et al., 1999). Zu den 16S-rRNA-Genen komplementäre DNA-Sonden eignen sich aufgrund der großen Menge identischer Abschnitte vor allem bei geringer Erregerdichte, besonders gut zum direkten Erregernachweis (GREISEN et al., 1994; LEY, 1998). Der Nachweis von 16S-rRNA-Genen ist also beweisend für das Vorhandensein bakterieller DNA, da eukaryotische Organismen über 80S-Ribosomen verfügen, die aus einer 60S- und einer 40S-Untereinheit zusammengesetzt sind, die ihrerseits aus einer 5S-, 28S-, 5,8S- und einer 18S-Untereinheit bestehen (WOESE, 1987; WOESE et al., 1990; AMANN et al., 1995; LEWIN, 1998).

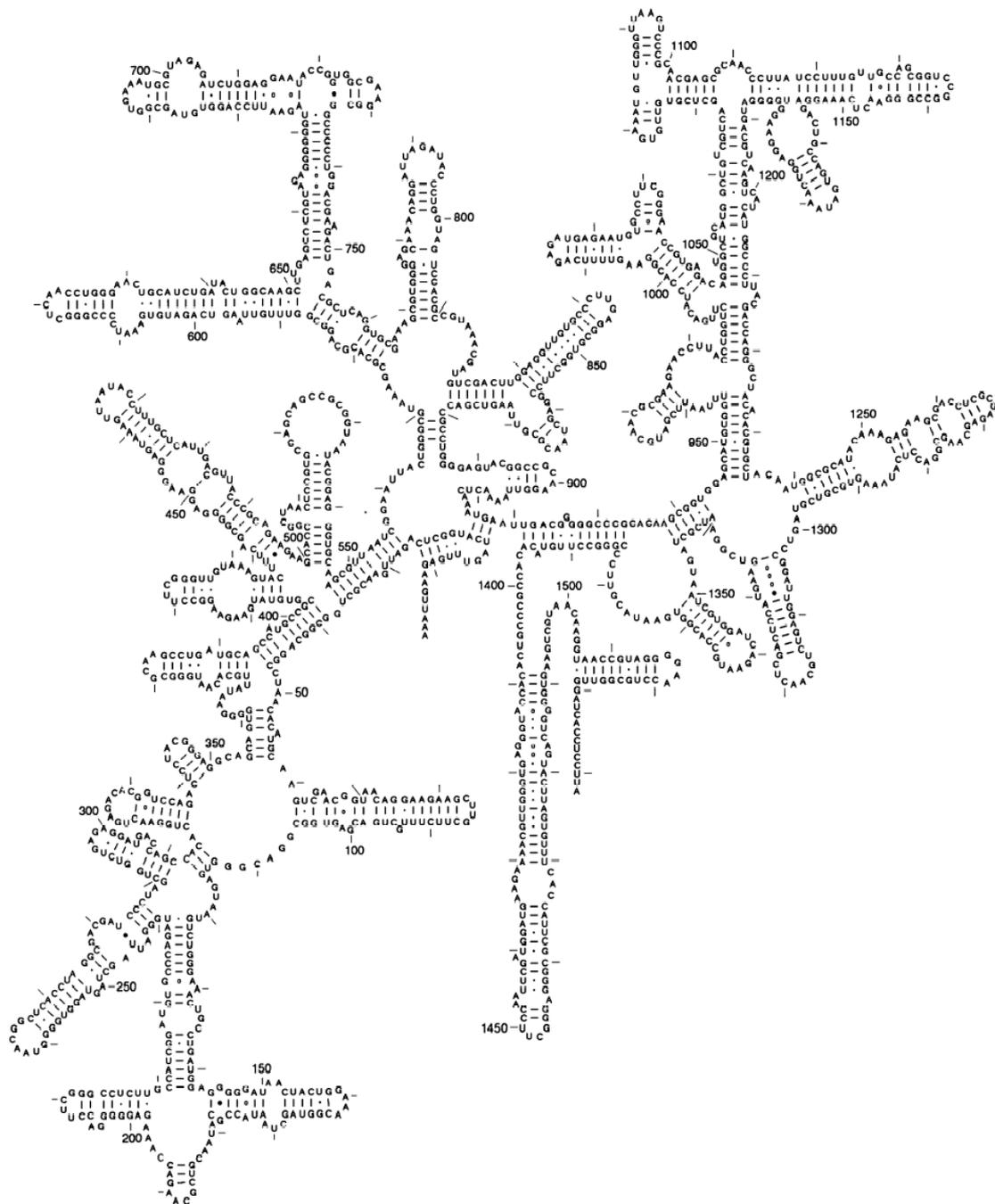


Abbildung 1: Sekundärstruktur der 16S-rRNA-Sequenz von *Escherichia coli* (aus WOESE et al., 1990)

Polymerasen sind Enzyme, die aus Nucleosidtriphosphaten Polynucleotide synthetisieren können. Dabei wird der Einzelstrang komplementär ergänzt. Die in

den Anfängen der PCR verwendeten Polymerasen, wie zum Beispiel das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von *E. coli*, waren hitzelabil und mussten so nach jedem Zyklus erneut zugesetzt werden. Heute sind verschiedene Polymerasen kommerziell erhältlich. Es handelt sich bei der hier verwendeten Polymerase um eine genetische Rekombinante (AmpliTaq[®]) der thermostabilen Taq- (*Thermus aquaticus*)-Polymerase (SAIKI et al., 1988).

Bei den Oligonukleotidprimern handelt es sich um synthetisch hergestellte Mehrfachnukleotide mit einer Länge von in der Regel 18 bis 28 Nukleotiden. Sie flankieren den zu amplifizierenden Bereich der DNA. Um die passenden Primer auswählen zu können, müssen die Sequenzdaten der Primerregion bekannt sein. Die einzelnen als Bausteine dienenden Nukleotide sollten in einem möglichst ausgeglichenen Verhältnis vorhanden sein (AMANN et al., 1995).

Oligonukleotidprimer werden von zahlreichen kommerziellen Anbietern in der gewünschten Sequenz vollautomatisch mit Hilfe von DNA-Synthesizern hergestellt. Die Anlieferung erfolgt meist in Form eines Trockenpellets. Vor der Verwendung muss daher eine Gebrauchslösung hergestellt werden. Die Herstellung der Primer-Gebrauchslösung erfolgt nach den jeweiligen Herstellerangaben.

In zahlreichen Disziplinen der Veterinär- und Humanmedizin werden bereits seit Jahren spezifische Gensonden zum Nachweis bakterieller DNA verwendet (AMANN et al., 1995; VOGT-HELLMUTH, 1996; KANE et al. 1998). Der erhebliche Nachteil dieses Vorgehens ist jedoch, dass der erwartete Erreger bekannt sein muss oder aber der Einsatz spezifischer Primergemische (Degenerate Sequence Primer) erforderlich wird. Daher liegt die Forderung nach einer Möglichkeit zur generellen Detektion bakterieller DNA nahe. Die 16S-rRNA-Gene enthalten zum Einen hochkonservierte Genabschnitte, die die Voraussetzung für einen Universalprimer bilden und zum Anderen variable Bereiche, die zur Identifikation der beteiligten Bakterienspezies geeignet sind (WILBRINK et al., 1998).

In der folgenden Tabelle werden einige Sequenzen und Einsatzbeispiel von in der Literatur beschriebenen 16S-rRNA-Universalprimern aufgeführt.

Tabelle 7: Universalprimer und verwendetes Untersuchungsmaterial

Autorengruppe	Material	Upstream Primer	Downstream Primer
KANE et al. (1998)	Blut	AGT TTG ATC CTG GCT CAG	GGA CTA CCA GGG TAT CTA
WILBRINK et al. (1998)	Synovia	AGA GTT TGA TCC TGG YTC AG	CTT TAC GCC CAR TAA WTC CG
CURSONS et al. (1999)	Blut	GAG GAA GGI GIG GAI GAC GT	AGG AGG TGA TCC AAC CGC
HEIJDEN et al. (1999)	Synovia	AGA GTT TGA TCC TGG YTC AG	CTT TAC GCC CAR TAA WTC CG
SLIGH et al. (2001)	Blut	CCT ACG GGA GGC AGC AG	GAC GTC RTC CNC DCC TTC CTC

Die vier Desoxynukleosidtriphosphate dATP, dGTP, dCTP und dTTP, kurz dNTP's sind die Bausteine der neu zu synthetisierenden DNA. Aus ihnen bilden die DNA-Polymerasen Polynukleotidketten. Die dNTP's werden dem Reaktionsansatz in großem Überschuss zugesetzt.

Da in der Regel mehrere Proben parallel für eine PCR vorbereitet werden, werden die einzelnen Komponenten als ein Mehrfaches vorgemischt und anschließend aliquotiert.

Enthalten sind das Primerpaar, MgCl₂, dNTP's, Puffer und destilliertes Wasser sowie die Polymerase. Der Zusatz der Ziel-DNA erfolgt erst nach der Aliquotierung.

3 PROBANDEN UND METHODEN

3.1 Probandenkollektiv

Die für die vorliegende Untersuchung herangezogenen Patienten und Kontrolltiere rekrutierten sich aus dem stationären und ambulanten Patientenkollektiv der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlichen Ambulanz der Justus-Liebig Universität Gießen. Es sei angemerkt, dass die Angaben bezüglich der Geburtsumstände, Kolostralversorgung und der Vorbehandlung vornehmlich aus den Besitzerauskünften erhoben wurden, und somit nicht überprüft werden konnten.

3.1.1 Allgemeine Daten

Insgesamt 73 Kälber verschiedener Rassen und Rassenkreuzungen gingen in die Untersuchung ein. Die am häufigsten vertretenen Rassen waren Holstein Schwarzbunte, gefolgt von Holstein Rotbunten und Deutschen Fleckvieh Kälbern. Die Rassen Charolais und Limousin sowie Kreuzungstiere waren ebenfalls vertreten (Tabelle 8, Abbildung 2).

Tabelle 8: Rasseverteilung der in die Untersuchung aufgenommenen Kälber

Rasseverteilung	Anzahl der Kälber (n)	Prozentualer Anteil (%)
Holstein Schwarzbunt	28	38,4
Holstein Rotbunt	11	15,0
Deutsch Fleckvieh	18	24,6
Limousin	1	1,4
Charolais	7	9,6
Holstein Rotbunt-Mix	2	2,7
Deutsch Fleckvieh-Mix	1	1,4
Limousin-Mix	5	6,9
Summe	73	100,0

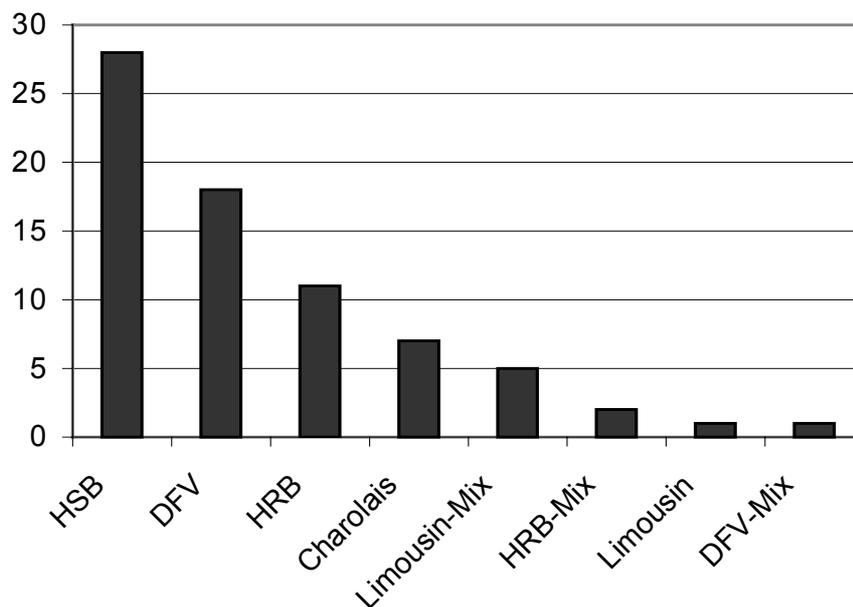


Abbildung 2: Rasseverteilung der in die Untersuchung aufgenommenen Kälber

Das Geschlechterverhältnis der einbezogenen Kälber war zu Gunsten der männlichen Tiere verschoben. Insgesamt wurden 43 (58,9%) männliche und 30 (41,1%) weibliche Tiere in die Untersuchung aufgenommen.

47 Kälber (64,4%) entstammten einer Spontangeburt, während 10 Kälber (13,7%) durch leichte, ein Kalb (1,4%) durch mittelschwere und fünf Kälber (6,8%) durch schwere konservative Geburtshilfe (KGH) entwickelt wurden. Bei weiteren 10 Kälbern (13,7%) erfolgte die Geburt mittels Sectio caesarea.

Die Aufstallung in der Klinik erfolgte in Einzelboxen auf Stroh. Fütterungsgrundlage der in der Klinik geborenen Kälber war in den ersten 48 Lebensstunden homologes Kolostrum. Stand dieses aufgrund entzündlicher Veränderungen des Muttereuters oder anderer Umstände (Muttertier verstorben oder getötet) nicht zur Verfügung, wurde auf ein heterologes Tiefgefrierkolostrum gesunder Mutterkühe zurückgegriffen. Ab dem dritten Lebenstag stellte Milchaustauscher, der aus einer Plastikflasche mit Kunststoffsauger und später aus Stahleimern angeboten wurde, die Ernährungsgrundlage dar. Die Fütterungsintervalle betragen in den ersten 24 Lebensstunden vier Stunden und verlängerten sich mit zunehmendem Lebensalter auf bis zu acht Stunden ab dem vierten Lebenstag. Solchen Kälbern, die aufgrund ihrer Erkrankung eine sehr schlechte Tränkeaufnahme zeigten, wurde zwischen den Tränkezeiten erneut Nahrung angeboten. Die Menge des Milchaustauschers wurde langsam auf sechs Liter pro Tag gesteigert. Kälber ab dem zehnten Lebenstag erhielten Wasser oder, bei vorliegenden enteralen Erkrankungen, elektrolytangereicherte Tränke sowie gutes Heu zur freien Aufnahme. Diejenigen Kälber, die als Kontrolltiere aus durch die Ambulanz der Klinik betreuten bäuerlichen Betrieben rekrutiert wurden, entstammten gut betreuten und gepflegten Nachzuchten. Die Haltung erfolgte in Kleingruppen bis zu 4 Tieren auf Stroh. Kolostrum wurde in ausreichender Menge (4 Liter in den ersten 12 Lebensstunden) angeboten, bevor die Tränke mit Milch oder Milchaustauscher im 12-Stundenintervall fortgeführt wurde. So war gewährleistet, dass alle Kontrollkälber eine genügende Menge an Kolostrum erhalten hatten.

Bei den als Patienten eingelieferten Kälbern stellte sich die Kolostralversorgung wie folgt dar: Eine ausreichende Versorgung mit Kolostrum (mindestens 4 Liter in den ersten 12 Lebensstunden) war bei 53 Kälbern (72,6%) gegeben, während 20 Patienten (26,4%) kein oder nur sehr geringe Mengen an Kolostrum in den ersten 12 Stunden *post natum* erhalten hatten.

3.1.2 Kontrolltiere

Zur Erlangung zuverlässiger Daten bezüglich der Aussagekraft eines positiven bakteriellen Nachweises im Blut wurden neben den erkrankten Kälbern auch 20 Kontrolltiere in die Untersuchung mit einbezogen. Diese zeigten weder vorberichtlich, noch zum Zeitpunkt der Untersuchung und Probenentnahme Anzeichen für eine klinische Erkrankung.

Insgesamt gehörten 13 der Kontrolltiere milchbetonten Niederungsrassen und 7 Kälber Fleischrassen an. Die Kontrolltiere entstammten vornehmlich der Rasse Holstein Schwarzbunt (11 Tiere, 55%), Deutsch Fleckvieh (5 Tiere, 25%) und der Rasse Holstein Rotbunt (2 Tiere, 10%). Des Weiteren wurde ein Limousin- (5%) sowie ein Kreuzungskalb dieser Rasse (5%) in das Kontrollkollektiv aufgenommen.

Tabelle 9: Rasseverteilung der Kontrollkälber

Rasseverteilung	Anzahl der Kälber (n)	Prozentualer Anteil (%)
Holstein Schwarzbunt	11	55,0
Holstein Rotbunt	2	10,0
Deutsch Fleckvieh	5	25,0
Limousin	1	5,0
Limousin-Mix	1	5,0
Summe	20	100,0

Dreizehn der Kontrolltiere (65%) waren männlichen, sieben (35%) weiblichen Geschlechtes.

Neun Tiere (45%) entstammten einer Spontangeburt, während drei Kälber (15%) durch leichte und je ein Kalb (5%) durch mittelschwere und schwere konservative Geburtshilfe (5%) entwickelt wurden. Bei den verbleibenden sechs Kälbern (30%) erfolgte die Entwicklung durch eine *Sectio caesarea*.

3.1.3 Erkrankte Tiere

Die erkrankten Tiere waren ausnahmslos Teil des stationären Patientengutes der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere mit Tierärztlicher Ambulanz.

Die Rasseverteilung der erkrankten Tiere ist in der folgenden Tabelle wiedergegeben.

Tabelle 10: Rasseverteilung der erkrankten Kälber

Rasseverteilung	Anzahl der Kälber (n)	Prozentualer Anteil (%)
Holstein Schwarzbunt	17	32,1
Holstein Rotbunt	9	17,0
Deutsch Fleckvieh	13	24,5
Charolais	7	13,2
Holstein Rotbunt-Mix	2	3,8
Deutsch Fleckvieh-Mix	1	1,9
Limousin-Mix	4	7,5
Summe	53	100,0

30 der erkrankten Tiere (56,6%) waren männlichen, 23 (43,4%) weiblichen Geschlechtes.

38 Tiere (71,7%) entstammten einer Spontangeburt, sieben Kälber (13,2%) einer leichten und vier Tiere einer schweren konservativen Geburtshilfe (7,55%). Bei den verbleibenden vier Kälbern (7,55%) erfolgte die Entwicklung durch *eine Sectio caesarea*.

Bei 41 der 53 Kälber wurde vor der Probenentnahme bereits eine antibiotische Therapie durch den Haustierarzt oder durch den Landwirt eingeleitet.

3.1.4 Gruppeneinteilung

Die Gruppeneinteilung erfolgte nach dem Schweregrad der Erkrankung.

Gruppe 1: Kälber mit einer klinischen Sepsis (19 Tiere)

Gruppe 2: Kälber mit hochgradiger Diarrhoe und/oder Bronchopneumonie, Meningitis, Nabelentzündung oder Arthritis (34 Tiere), im Folgenden werden diese „schwer einzelorganerkrankte Tiere“ genannt

Gruppe 3: Gesunde Kontrolltiere (20 Tiere)

In die unterschiedlichen Gruppen wurden erkrankte Kälber bis zu einem Alter von 23 Tagen mit vorliegender schwerer Allgemeinerkrankung aufgenommen. Dabei handelte es sich neben Fällen einer klinischen Sepsis vor allem um hochgradige Enteritiden, Bronchopneumonien, Meningitiden, fieberhafte Nabelinfektionen und Gelenkerkrankungen. Die Diagnose einer Sepsis wurde aufgrund der klinischen Untersuchungsparameter gestellt.

Zur Aufnahme in das Probandenkollektiv mussten mindestens drei der folgenden Parameter erfüllt sein:

- Hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden
- Vorliegen einer Lokalinfektion
- Körperinnentemperatur > 39,0°C oder < 37,5°C
- Fehlen des Saugreflexes
- Verändertes Schleimhautkolorit

Ausgenommen hiervon sind Kälber mit arthritischen und omphalitischen Veränderungen, die lediglich zwei der genannten Parameter erfüllen mussten.

Retrospektiv wurde das Schicksal der einbezogenen Kälber bis zur Entlassung oder bis zum Versterben verfolgt.

3.2 Methodik

3.2.1 Klinische Untersuchung

Die klinische Untersuchung der Kälber erfolgte segmental. Nach der Beurteilung des Allgemeinbefindens, Messung der Körpertemperatur und Auszählung der Puls- und Atemfrequenz wurden die Mundschleimhaut, die Episkleralgefäße und die Position des Bulbus in der Orbita bewertet. Danach erfolgte die Untersuchung des Respirationstraktes und des Nabels sowie die Bewertung der Kotkonsistenz.

Zur Eingrenzung einer klinisch manifesten Sepsis wurden folgende symptomatische Parameter herangezogen:

1. Hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden
2. Fehlen des Saugreflexes
3. Eingeschränktes Stehvermögen
4. Injizierte Episkleralgefäße
5. Verändertes Schleimhautkolorit
6. Vorliegen eines fokalen Entzündungsherd

Nach der klinischen Untersuchung wurde den Kälbern jeweils eine Blutprobe zur Anfertigung einer Blutkultur, zum labordiagnostischen Nachweis bakterieller DNA mittels PCR, zur Anfertigung eines Differentialblutbildes sowie zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes entnommen.

3.2.2 Blutprobenentnahme

Die Blutproben wurden durch Punktion der linksseitigen Vena jugularis am Übergang des ersten zum zweiten Halsdrittel gewonnen. Befand sich auf dieser Halsseite bereits ein Venenverweilkatheter, so wurde zur Blutentnahme die kontralaterale Halsseite punktiert. Dazu wurden die Haare im Bereich der Entnahmestelle auf einer Fläche von 15x20 cm geschoren und anschließend mit einem geeigneten Hautantiseptikum (Skinsept G[®] Lösung, Henkel, Düsseldorf) gereinigt und entfettet. Danach wirkte das Desinfektionsmittel mindestens für die durch den Hersteller vorgegebene Zeit (30 Sekunden) ein.

Zur Blutentnahme wurden verschiedene, kommerziell erhältliche Blutentnahmesysteme erprobt. Die mit einem vorgegebenen Unterdruck arbeitende Vacuette[®] (Greiner, Kremsmünster, Österreich) erwies sich als ungeeignet zur Anwendung beim Kalb, da Nadelstärken nur bis 0,9x40 mm, entsprechend einer gelben Kanüle, erhältlich waren und der Unterdruck im Entnahmegefäß nicht für eine zuverlässige Blutentnahme ausreichte. Auch war die kontaminationsfreie Überführung der gewonnenen Blutprobe in das Kulturmedium problematisch. Die Sicherheitsmonovette[®] der Firma Sarstedt (Nümbrecht) erwies sich trotz gleicher Nadelstärken als geeigneter. Dieses System arbeitet mit einem Zugkolben. Der benötigte Unterdruck kann so individuell dem jeweiligen Bedarf angepasst werden. Sowohl das dem Tier abgewandte Nadelende als auch der Einlass der Monovette sind mit einer Gummimembran verschlossen, die erst beim Zusammenfügen der Elemente durchstoßen wird und so eine kontaminationslose Blutentnahme möglich macht. Um eine Hämolyse zu verhindern, erwies sich eine kurze und nicht zu kräftige manuelle Stauung der Vene als bestes Verfahren. Das austretende Blut konnte so langsam an der Röhrchenwand entlanglaufen.

Je Blutentnahme wurden 9 ml Vollblut zur Anfertigung einer Blutkultur, 9 ml EDTA-Blut für den Nachweis bakterieller DNA mittels PCR sowie ein weiterer Milliliter

EDTA-Blut zur Anfertigung eines Blutbildes und zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes entnommen.

3.2.2.1 Entnahmeintervalle

Die erste Probe wurde nach der Einlieferung in die Klinik, beziehungsweise nach der Diagnosestellung am Tier, gewonnen. Die Folgeprobengewinnung erfolgte 8-12 Stunden danach. Bei fortbestehendem Fieber über 24 Stunden nach Therapiebeginn wurde eine weitere Probe gezogen.

Als Kontrolltiere dienten überwiegend in der Klinik geborene, gesunde Kälber. Bei 7 der 20 Kontrollkälber erfolgte die Probenentnahme in, durch die Ambulanz der Klinik betreuten, landwirtschaftlichen Betrieben.

3.2.2.2 Blutprobenlagerung

Die gewonnenen Blutproben für den blutkulturellen Nachweis wurden unmittelbar nach der Entnahme in das Kulturmedium überführt und in das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer) der Justus-Liebig Universität in Gießen weitergeleitet. Die Bestimmung des Differentialblutbildes und die Messung des Gesamtproteingehaltes fanden unmittelbar nach der Probenentnahme in der Klinik statt.

Die Proben für die molekularbiologische Untersuchung wurden nach Trennung von Plasma und Blutsäule bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung tiefgekühlt .

3.2.3 Blutbildmessung

Die erhobenen Blutparameter wurden mit Hilfe des CELL-DYN 3500[®] Hämatologieanalysesystems (Abbott Diagnostika GmbH, Wiesbaden-Delkenheim) bestimmt. Die Evaluation des CELL-DYN 3500[®] zur Bestimmung des Differentialblutbildes beim Rind wurde 1998 durch BLEUL vorgenommen.

Das verwendete Blutanalysegerät CELL-DYN 3500[®] misst mit zwei unterschiedlichen Prinzipien. Zum Einen erfolgt eine optische Messung (WOC) und zum Anderen eine Widerstandsmessung (WIC). Die Werte beider Messungen werden miteinander verglichen und bei Übereinstimmung als Endwert angegeben (BLEUL, 1998; JAIN, 2001; BLEUL et al., 2002; HOLSTEG, 2002).

Die optische Messung erfolgt nach dem Prinzip der Flow-Zytometrie. Zur Bestimmung der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Zellen oder anderen biologischen Partikeln müssen diese in einem Flüssigkeitsstrom einen oder mehrere Sensoren passieren. Hierzu muss die Probe verdünnt werden, um die Zellen einzeln in einem Probenstrom am Detektor vorbeizuführen (EDER und FRITSCHKE, 1986, HOLSTEG, 2002). Passieren zwei oder mehr Zellen gleichzeitig den Messwandler, wird nur ein Signal verarbeitet. Um diese Koinzidenzen zu vermeiden, wird eine hohe Verdünnung gewählt und der Durchmesser des Probenstroms auf ein Minimum reduziert, so dass die Zellen einzeln erfasst werden können. Bei dem hier verwendeten Blutanalyseystem CELL-DYN 3500[®] werden die Zellen an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Je nach Intensität des gestreuten Lichtes können die verschiedenen Zellpopulationen nach Zellgröße, der inneren Zellstruktur und der jeweiligen

Oberflächenmorphologie differenziert werden (BLEUL, 1998; MORITZ, 2000; JAIN 2001; BLEUL et al., 2002; HOLSTEG, 2002).

Die von den Zellen ausgehenden optischen Signale werden in elektrische Impulse umgewandelt und dem jeweiligen Zelltyp zugeordnet. Mit diesem Verfahren gelingt

die Differenzierung von neutrophilen, eosinophilen und basophilen Granulozyten sowie die der Lymphozyten und Monozyten.

Zur Widerstandsmessung passiert die verdünnte Blutprobe nach Hämolyse der Erythrozyten eine Messöffnung, durch welche ein elektrischer Strom fließt. Durch die Passage der Blutzelle durch eine Messöffnung tritt eine Erhöhung des elektrischen Widerstandes ein, in dessen Folge ein messbarer elektrischer Impuls entsteht. Die Amplitude des entstehenden Impulses ist direkt proportional zum Volumen des Partikels. Die Anzahl der gemessenen Impulse gibt die Anzahl der gemessenen Partikel wieder.

Die Bestimmung und Quantifizierung der Erythrozyten und Thrombozyten erfolgt ebenfalls durch eine Widerstandsmessung. Die Art der Aufbereitung und der Verdünnung ist hierzu modifiziert.

Der Hämatokrit (HTC, PCV) ist abhängig von Zahl und Volumen der Erythrozyten und dem Plasmavolumen und stellt somit einen Relativwert dar, der das Verhältnis von Blutkörperchen zu Plasma wiedergibt. Bei der Messung mit CELL-DYN 3500[®] wird der Hämatokrit nach folgender Formel berechnet:

$$\text{HTC} = \text{RBC} \times \text{MCV} : 10$$

3.2.4 Bestimmung des Gesamtproteingehaltes

Die Ermittlung des Gesamteiweißgehaltes erfolgte mittels eines Refraktometers (HRM-18, Hand-Refraktometer NO.19540, Krüss, Hamburg). Dazu wurde ein Plasmatropfen in die Messzelle eingebracht und der Gesamtproteingehalt auf der dazugehörigen Skala abgelesen.

3.2.5 Blutkulturelle Untersuchung

Als Blutkulturmedium wurde das SIGNAL-Blutkultursystem BC 100 der Firma Oxoid (Wesel) verwendet.

Dieses System setzt sich aus der die Nährlösung enthaltenden Blutkulturflasche und einem Aufsatz (Signalaufsatz) zusammen. Dieser Aufsatz besteht aus einer transparenten Signalkammer, einem Adapterring und einer Kanüle, die in die oberhalb gelegene Kammer mündet. Die Kammer ist durch einen verschraubbaren Deckel verschlossen, der einen hydrophoben und bakteriendichten Filter enthält, welcher für eine sichere und kontaminationsfreie Belüftung des Systems sorgt. Die Pfeilmarkierung am oberen Etikettenrand gibt die maximale Füllhöhe des Blut-Nährbodengemisches an.

Das durch den Bakterienstoffwechsel gebildete Gas breitet sich im Leerraum der Flasche aus und drückt auf den Flüssigkeitsspiegel, der über die Kanüle in die Signalkammer aufsteigt. Das Ansteigen des Flüssigkeitsspiegels in der Signalkammer bis oberhalb des Adapterringes deutet auf das Vorhandensein von bakteriellen Erregern im Nährmedium hin.

Unmittelbar im Anschluss an die Entnahme der Blutprobe ist diese nach vorheriger Desinfektion des Gummiverschlusses mit einer frischen Kanüle in das Medium verbracht worden. Bis zur Weiterleitung in das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere, die bis zu maximal 12 Stunden betrug, wurden die Blutkulturflaschen bei Raumtemperatur gelagert.

Im Untersuchungsinstitut fand die weitere Bearbeitung der Proben statt. Die mit dem Signalaufsatz versehenen Proben wurden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Im Abstand von zwei Tagen fand eine Übertragung der in den Signalaufsatz aufgestiegenen Flüssigkeit auf eine Blutagarplatte statt, um ein eventuell vorhandenes Erregerwachstums nachzuweisen. Die weitere Differenzierung erfolgte nach standardisierten mikrobiologischen Methoden.

Als signifikante Sepsiserreger wurden solche Keime angesehen, die nicht zur physiologischen Hautflora gehören oder als Umweltkeim gelten und somit höchstwahrscheinlich keine Kontamination im Zuge der Probenentnahme darstellen.

3.2.6 Molekularbiologische Blutuntersuchung

Die Untersuchungskonzeption sah eine Aufteilung in Vor- und Hauptversuche vor. Die Vorversuche dienten zur Überprüfung der Sensitivität des verwendeten Oligonukleotidprimers und somit zur Etablierung der Methode. Die Hauptversuche beinhalten die Untersuchung der Probandenblutproben.

3.2.6.1 Vorversuche

Da die in dieser Arbeit zur Anwendung kommenden Oligonukleotidprimer eine Vielzahl unterschiedlicher Erreger detektieren und ein Sensitivitätsnachweis für jeden einzelnen Keim mit einem erheblichen Aufwand verbunden wäre, wurde eine Auswahl folgender Bakterien getroffen.

- *Arcanobacterium pyogenes*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Salmonella typhimurium*
- *Escherichia coli* O78:K80
- *Staphylococcus aureus*

Die Keime wurden in einer Anreicherungsbouillon vermehrt, abzentrifugiert und nach der in Kapitel 3.2.6.2 beschriebenen Methode weiterverarbeitet.

Die so gewonnene, hochkonzentrierte Bakterien-DNA wurde in den Hauptversuchen als Positivkontrolle mitgeführt.

Zur Bestimmung der Sensitivitätsgrenze der PCR und des Blutkulturmediums wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) in den jeweiligen Stammsuspensionen der genannten Bakterienspezies bestimmt. Dazu sind Verdünnungen von 10^{-3} - 10^{-15} hergestellt worden. Von den jeweiligen Verdünnungsstufen wurden 10 μ l in Form eines laufenden Tropfens zur Keimzahlbestimmung auf eine Blutagarplatte (BAP) aufgebracht und für 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

Um die Genauigkeit der KBE-Bestimmung zu verbessern, erfolgte jede Auszählung im Doppelansatz. Dazu wurde eine Blutagarplatte durch eine Markierung in eine linke und eine rechte Hälfte geteilt. Die Ergebnisse der Keimzählung sind in Kapitel 4.2.1 dargestellt.

3.2.6.2 Hauptversuche

Bevor die Blutproben auf das Vorhandensein bakterieller DNA untersucht wurden, musste eine DNA-Aufreinigung und DNA-Extraktion durchgeführt werden. Die dazu erforderlichen Schritte werden im Folgenden erläutert.

3.2.6.2.1 Plasmaextraktion

Zur Plasmaextraktion müssen jeweils 9 ml EDTA-Blut mit 1500 Umdrehungen pro Minute (400 RCF) für sechs Minuten abzentrifugiert werden (Rotanta 96 R, Hettich, Tuttlingen). Dadurch können Plasma, Leukozyten und Erythrozyten in

dieser Reihenfolge, entsprechend ihrer Dichte, aufgetrennt werden. Das Plasma wird in ein 2 ml Tube überführt und bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.2.6.2.2 Leukozytenextraktion

Der verbleibenden Blutsäule, inklusive des Buffy-coats, werden 20 ml Red Blood Cell Lysis Solution (RBCLS, Tabelle 11) zugesetzt. Durch kurzes Aufschütteln erfolgt die Vermischung der Blutsäule mit der Lösung. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird die Lösung für eine Minute bei 1500 Umdrehungen pro Minute (400 RCF) abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Dem verbleibenden Pellet wird erneut RBCLS zugesetzt und das Gemisch geschüttelt. Dieser Vorgang wird wiederholt, bis das Leukozytenpellet eine weiße Farbe angenommen hat.

Tabelle 11: RBCLS, Art und Menge der verwendeten Substanzen

Substanz	Menge
Ammoniumchlorid	8,29 g
Kaliumhydrogencarbonat	1,0 g
EDTA	0,5 ml einer 0,2 M Lösung

3.2.6.2.3 Extraktion bakterieller DNA aus Leukozyten

Nach Resuspensierung des Leukozytenpellets wird dieses mit 180 µl Lysozymlösung (Tabelle 12) vermischt.

Tabelle 12: LysozymbLösung, Art und Menge der verwendeten Substanzen

Substanz	Menge	Bezugsquelle
Tris-HCL 0,5 M	1 ml	USB, Cleveland, USA
EDTA 0,5 M	0,1 ml	Serva, Heidelberg
Triton 100%	0,3 ml	Roth, Karlsruhe
Lysozym	0,5 g	Roth, Karlsruhe
<i>Aqua bidestillata</i>	<i>ad 25,0 ml</i>	Roth, Karlsruhe

Die weiteren Arbeitsschritte entsprechen denen der Extraktion bakterieller DNA aus Plasma und werden deshalb dort (Kapitel 3.2.6.2.4) gemeinsam abgehandelt.

3.2.6.2.4 Extraktion bakterieller DNA aus Plasma

Das gewonnene Plasma wird mit 7500 Umdrehungen (5780 RCF) pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert (EBA 12 R, Hettich, Tuttlingen). Nach Verwerfen des Überstandes kann der Rückstand mit 180 µl LysozymbLösung resuspendiert werden.

Die im Folgenden erörterten Arbeitsschritte gelten gleichermaßen für die Extraktion bakterieller DNA aus Plasma sowie aus Leukozyten.

Das LysozymbLösungs-Probengemisch wird bei 37°C für 12 Stunden inkubiert. Dabei erfolgt zum Einen die hydrolytische Aufspaltung der Leukozytenproteine, zum Anderen wird die umfangreiche Mureinschicht der grampositiven Bakterien aufgebrochen. Die DNA-Extraktion erfolgt mittels Qiagen QLAmp DNA Extraktionskit (Hombrechtikon, Schweiz). In ein Tube werden 20 µl Proteinase K vorgelegt, welche mit 200 µl der Probe und anschließend mit 200 µl Buffer AL überschichtet werden. Nach 15-sekündigem Schütteln und kurzem Abzentrifugieren werden die Proben bei 56°C für 30 Minuten und darauf folgend

bei 95°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend werden 200 µl Ethanol (96-100%ig, Riedel-de Haën AG, Seelze) der Probe zugegeben.

Nach Schütteln und kurzem Abzentrifugieren kann dieses Gemisch in eine QLamp-Säule überführt und bei 8000 Umdrehungen pro Minute (6580 RCF) eine Minute lang zentrifugiert werden.

Die Säule wird nun in ein frisches Sammel tube gestellt. Im Folgenden werden 500 µl AW1 Puffer hinzugefügt und die Probe bei 8000 Umdrehungen pro Minute (6580 RCF) für eine weitere Minute zentrifugiert. Im Anschluss erfolgt ein erneutes Umsetzen in ein frisches Sammel tube unter Zusatz von 500 µl AW2 Puffer. Bei 14000 Umdrehungen pro Minute wird die Probe weitere 3 Minuten zentrifugiert. Die Säule wird nun unter Zusatz von 120 µl AE Puffer in ein 1,5 ml Tube gestellt, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich bei 8000 Umdrehungen pro Minute (6580 RCF) 1 Minute zentrifugiert. Die so gewonnene, isolierte DNA wird bei -20°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der isolierten DNA kann photometrisch vorgenommen werden, ist jedoch in diesem Fall nicht relevant, da ebenfalls Leukozyten-DNA in den Proben vorhanden ist und das Messergebnis so keinen Rückschluss auf die Konzentration der bakteriellen DNA zulässt.

3.2.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Der Ansatz, der je Probe mit einem Gesamtvolumen von 25 µl pipettiert wird, ist in Tabelle 13 dargestellt.

Tabelle 13: PCR Ansatz, Art und Menge der verwendeten Substanzen

Substanz	Menge	Hersteller
Puffer (10x PCR Buffer II)	2,5 µl	Roche, New Jersey, USA
MgCl-Solution (25 mM)	1,1 µl	Roche, New Jersey, USA
dNTP (10 mM)	0,5 µl	Roth, Karlsruhe
<i>Aqua bidestillata</i>	13,6 µl	Roth, Karlsruhe
AmpliTaq Polymerase (5 U/µl)	0,3 µl	Roche, New Jersey, USA
Upstream Primer	1,0 µl	Roth, Karlsruhe
Downstream Primer	1,0 µl	Roth, Karlsruhe
isolierte DNA aus der Probe	5,0 µl	eigene Herstellung

Beim gleichzeitigen Anfertigen mehrerer PCR-Ansätze werden diese im Mastermix gemeinsam angesetzt. Alle Zusätze, mit Ausnahme der Polymerase, werden vor Gebrauch kurz geschüttelt (Vortex 2 Genie, Scientific Industries, New York) und abzentrifugiert. Die Polymerase muss eisgekühlt bleiben, da eine vorzeitige Erwärmung zu einem späteren Aktivitätsverlust führen kann.

Durch die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer zum Nachweis der 16S-rRNA-Gene (rDNA) werden Amplifikationsprodukte mit einer Größe von 365 Basenpaaren zwischen den Nukleotiden 1175 und 1540 generiert (Beispiel *Escherichia coli*). Sie besitzen folgende Sequenzen:

Upstream Primer: 5`GAG GAA GGI GIG GAI GAC GT 3`

Downstream Primer: 5`AGG AGG TGA TCC AAC CGC 3`

G=Guanin, A=Adenin, T=Thymin, C=Cytosin, I=Inosin, vierfach variable Bindungsstelle

Die fertig vorbereiteten Proben werden in den Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer, Überdingen) verbracht. Dieser stellt einen vollautomatischen, programmierbaren Heizblock dar. Das verwendete Programm ist in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 14: Thermal Cycler-Programmierung

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeitdauer (Sekunden)
1	95°C	30
2	95°C	15
3	55°C	45
4	72°C	45
5	72°C	10

Nach dem ersten Reaktionsschritt werden die Schritte 2 bis 5 dreißigfach wiederholt.

3.2.8 Optische Darstellung der PCR-Produkte

3.2.8.1 Agarosegelherstellung (2%ig)

Ein Gramm Agarose wird mit einfacher TAE-Lösung (UV-Safe-TAE[®] Fertigpufferlösung, MWG-Biotech, Munchenstein) auf 50 ml aufgefüllt, in der Mikrowelle (Siemens, München) bis zur völligen Lösung des Agarosepulvers erhitzt und nach Zusatz von 5 µl Ethydiumbromid in eine entsprechende Form ausgegossen. Durch die Wahl eines geeigneten Kammes wird die Anzahl und das Fassungsvermögen der Geltasche gewählt. Nach Erstarren des Gels wird der Kamm entfernt. Das fertige Gel wird in die Elektrophoresekammer (Owl Separation Systems, Portsmouth, USA) überführt.

3.2.8.2 Probenaufbereitung für die Agarosegelelektrophorese

Es werden 10 µl des jeweiligen PCR-Produktes mit 2,5 µl Blue Run vermischt und anschließend in die Gelkammern eingebracht. In der ersten Tasche wird stets der

Standard (100 base pair ladder, Roche, Mannheim) aufgetragen. Bedeckt mit TAE-Lösung wird ein elektrischer Strom angelegt. Da Nukleinsäuren in wässriger Lösung aufgrund des Zucker- und Phosphatanteiles negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Die zurückgelegte Wegstrecke verhält sich proportional zur gewählten Dichte der Gelmatrix (hier 2%ig) und dem Logarithmus des Molekulargewichtes der DNA .

3.2.8.3 Agarosegelelektrophorese

Verwendet wird die Elektrophoresekammer der Firma Owl Separation Systems, Portsmouth, USA. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 90 Volt für etwa 45 Minuten, so dass eine Laufstrecke von mindestens 3 cm erreicht wird.

Durch die Einlagerung des dem Gel zugesetzten Ethydiumbromids in die DNA kann diese anschließend unter UV-Licht optisch dargestellt werden (FotoPrep I, Fotodyne, Biometra, Göttingen). Zur dauerhaften Dokumentation des Ergebnisses wird ein Ausdruck mittels Thermoprinter (Digital Graphic Printer UP-D860E, Sony, Köln) angefertigt.

3.2.8.4 PCR-Kontrollproben

Um die Aussagekraft des PCR-Produktes zu kontrollieren, wird bei jedem PCR-Ansatz mindestens eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Als Positivkontrolle dient 1 µl reine Bakterien-DNA (siehe Kapitel 3.2.6.1). Die Negativkontrolle besteht aus 1 µl *Aqua bidestillata* an Stelle der Proben-DNA im PCR-Ansatz.

3.2.8.5 Kontaminationsverhütung

Um falsch positive Nachweise durch Kontamination während der Probenaufbereitung zu verhindern, werden folgende Maßnahmen ergriffen:

Während der gesamten Probenaufbereitungszeit werden Latexhandschuhe getragen. Der Mastermix für die PCR wird in einem gesonderten Raum unter besonders kontaminationsarmen Bedingungen (pre-PCR) hergestellt.

Es werden des Weiteren nur mit einem Filtereinsatz versehene (gestopfte) Pipettenspitzen verwendet. Der Zusatz der Proben-DNA findet in einem separierten Raum unter besonderen kontaminationsarmen Bedingungen statt.

3.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch die Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereiches Veterinärmedizin der Justus-Liebig Universität Gießen, unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes BMDP/Dynamic, Release 7.0 (DIXON, 1993) und des Biometrischen Analysesystems (BiAS) für Windows. Die graphischen Abbildungen wurden mit den Programmen PlotIT 2.0 und PlotIT für Windows sowie Microsoft Excel erzeugt. Bei den quantitativen Variablen erfolgte die Datenbeschreibung durch die Angabe der Mediane, der Quartile sowie der kleinsten und größten Beobachtungen mit Darstellung im Box and Whisker-Plot. Bei der Bewertung statistischer Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha=0,05$ zugrunde gelegt.

4 ERGEBNISSE

4.1 Optimierung der Lysispufferinkubationszeit

Aus früheren Untersuchungen von CURSONS et al. (1999) ist bekannt, dass die DNA grampositiver Bakterien aufgrund des andersartigen Aufbaues der Zellwand schwieriger zu gewinnen ist als jene der gramnegativen Erreger. Daher wurde im Vorfeld der klinischen Untersuchungen eine Versuchsreihe zur Bestimmung der benötigten Lysispufferinkubationszeit angefertigt.

Voraussetzung dafür war die Bestimmung der DNA-Konzentration im Isolat nach definierten Inkubationszeiten der Bakterienstammsuspensionen (Tabelle 15).

Tabelle 15: DNA-Konzentration (ng/μl) in der Bakterienstammsuspension der verschiedenen Keime in Abhängigkeit zur Lysispufferinkubationszeit

Keimart	Konzentration (ng/ml)		
	30 Minuten	4 Stunden	20 Stunden
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	5,0	6,0	38,8
<i>Salmonella typhimurium</i>	87,5	81,3	80
<i>Escherichia coli</i>	130	125	135
<i>Staphylococcus aureus</i>	2,25	4,75	8,5

Tabelle 15 und Abbildung 3 verdeutlichen, dass *E. coli* und *Salmonella typhimurium* bereits nach einer dreißigminütigen Inkubationszeit eine deutlich höhere DNA-Konzentration aufweisen als *Arcanobacterium pyogenes* und *Staphylococcus aureus* nach einer zwanzigstündigen Lysis.

Arcanobacterium pyogenes zeigt eine 7,75 fache Konzentrationssteigerung zwischen der dreißigminütigen und der zwanzigstündigen Inkubationszeit. Dieser

Faktor beträgt für *E. coli* lediglich 1,04, für *Staphylococcus aureus* 3,78 und für *Salmonella typhimurium* 0,91.

Aufgrund der Resultate dieser Vorstudie wurde für die Hauptversuche eine mittlere Inkubationszeit von 12 Stunden festgelegt.

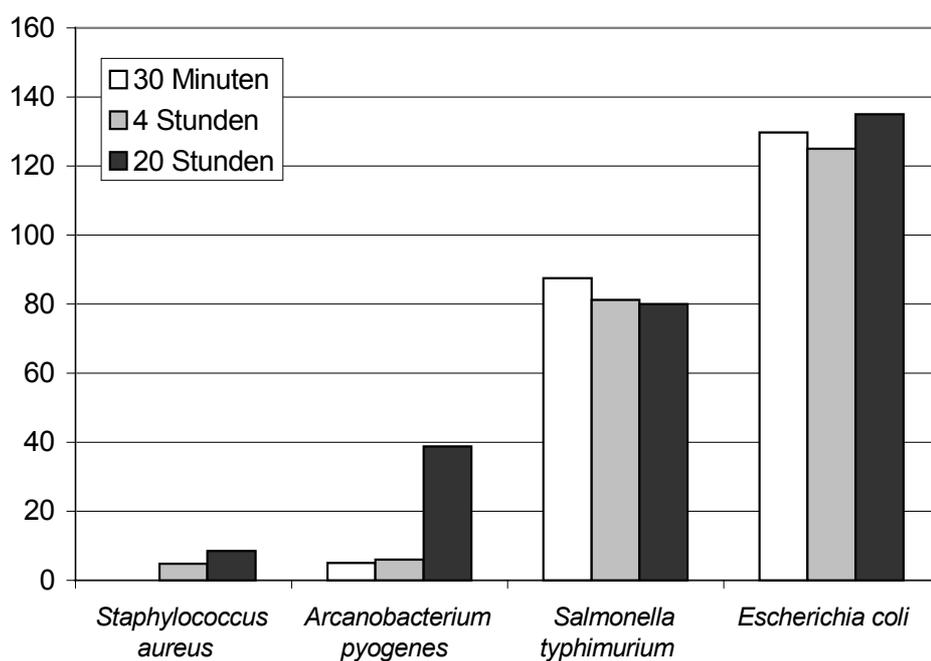


Abbildung 3: DNA-Konzentration (ng/μl) in Abhängigkeit zur Lysispufferinkubationszeit der Bakterienstammsuspension

4.2 Sensitivitätsnachweis

4.2.1 Bestimmung der Keimkonzentration in der Bakterienstammlösung

Zur Bestimmung der Sensitivitätsgrenze der PCR und des Blutkulturmediums musste zunächst die Anzahl koloniebildender Einheiten (KBE) in den jeweiligen Stammsuspensionen der verwendeten Bakterien (*Arcanobacterium pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli*) ausgezählt werden. Dazu wurden von den Verdünnungsstufen 10^{-3} bis 10^{-15} jeweils 10 μ l im Doppelansatz auf eine Blutagarplatte aufgebracht und nach vierundzwanzigstündiger Bebrütung ausgezählt.

Aus den Tabellen 16 bis 20 sind die Ergebnisse der Keimzählungen der verschiedenen Bakterienspezies in den jeweiligen Verdünnungsstufen zu entnehmen.

Tabelle 16: *Arcanobacterium pyogenes*, Keimwachstum im Doppelansatz in Abhängigkeit zur jeweiligen Verdünnungsstufe der Bakterienstammsuspension

Verdünnungsstufe	KBE links	KBE rechts	Mittelwert
10^{-6}	nz	nz	nz
10^{-7}	10	10	10
10^{-8}	1	1	1
10^{-9}	0	0	0
10^{-10}	0	0	0

nz= nicht zählbar

Tabelle 17: *Staphylococcus aureus*, Keimwachstum im Doppelansatz in Abhängigkeit zur jeweiligen Verdünnungsstufe der Bakterienstammsuspension

Verdünnungsstufe	KBE links	KBE rechts	Mittelwert
10^{-6}	nz	nz	nz
10^{-7}	9	11	10
10^{-8}	0	2	1
10^{-9}	0	0	0
10^{-10}	0	0	0

Tabelle 18: *Klebsiella pneumoniae*, Keimwachstum im Doppelansatz in Abhängigkeit zur jeweiligen Verdünnungsstufe der Bakterienstammsuspension

Verdünnungsstufe	KBE links	KBE rechts	Mittelwert
10^{-7}	nz	nz	nz
10^{-8}	9	11	10
10^{-9}	0	2	1
10^{-10}	0	0	0

Tabelle 19: *Salmonella typhimurium*, Keimwachstum im Doppelansatz in Abhängigkeit zur jeweiligen Verdünnungsstufe der Bakterienstammsuspension

Verdünnungsstufe	KBE links	KBE rechts	Mittelwert
10^{-6}	nz	nz	nz
10^{-7}	74	66	70
10^{-8}	10	8	9
10^{-9}	1	1	1
10^{-10}	0	0	0

Tabelle 20: *Escherichia coli*, Keimwachstum im Doppelansatz in Abhängigkeit zur jeweiligen Verdünnungsstufe der Bakterienstammsuspension

Verdünnungsstufe	KBE links	KBE rechts	Mittelwert
10^{-6}	nz	nz	nz
10^{-7}	70	63	66,5
10^{-8}	7	5	6
10^{-9}	2	0	1
10^{-10}	0	0	0

Anhand der Ergebnisse der Keimauszählungen fand die Bestimmung der Keimkonzentrationen der entsprechenden Bakterienstammsuspensionen statt (Tabelle 21). Diese Werte dienten als Berechnungsgrundlage der Sensitivitätsbestimmung des Blutkultursystems und der Polymerasekettenreaktion.

Tabelle 21: Keimkonzentrationen (KBE/ml) der verschiedenen Bakterien in der Bakterienstammsuspensionen

Keimart	Konzentration (KBE/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^{10}
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	10^{10}
<i>Salmonella typhimurium</i>	$8,7 \times 10^{10}$
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10^{11}
<i>Escherichia coli</i>	$7,5 \times 10^{10}$

4.2.2 Sensitivität des Blutkultursystems

Sowohl in der Blutkultur als auch in der PCR wurde der Einsatz eines Probenvolumens von 10 µl veranschlagt. Da die Bakteriensuspension jedoch aufgrund des Gummistopfenverschlusses der Blutkulturflasche Oxoid BC100 nur mittels einer Injektionskanüle kontaminationsfrei zu übertragen war, wurde die zehnfache Menge der jeweils nächst höheren Verdünnungsstufe eingebracht. Die Bebrütung erfolgte bei 37°C für 96 Stunden. Die Übertragung der aufgestiegenen Flüssigkeit der Signalkammern auf eine Blutagarplatte fand nach 24, 48, 72 und 96 Stunden statt. Nach vierundzwanzigstündiger Inkubation konnte das Erregerwachstum abgelesen und dokumentiert werden.

In den Tabellen 22-26 ist das Wachstum der Keime im Blutkulturmedium in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit dargestellt.

Tabelle 22: *Arcanobacterium pyogenes*, blutkulturelles Wachstum in Abhängigkeit zur Verdünnungsstufe und Inkubationsdauer

Inkubationsdauer	Verdünnungsstufen					
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰
Blutkultur 24 Stunden	trüb	trüb	trüb	klar	klar	klar
Blutkultur 48 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Blutkultur 72 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Blutkultur 96 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Signalausstrich 24 Stunden	nz	nz	30	-	-	-
Signalausstrich 48 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 72 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 96 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-

Tabelle 23: *Staphylococcus aureus*, blutkulturelles Wachstum in Abhängigkeit zur Verdünnungsstufe und Inkubationsdauer

Inkubationsdauer	Verdünnungsstufen						
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
Blutkultur 24 Stunden	trüb	trüb	klar	klar	klar	klar	Klar
Blutkultur 48 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar	klar
Blutkultur 72 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar	klar
Blutkultur 96 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar	klar
Signalausstrich 24 Stunden	nz	nz	nz	-	-	-	-
Signalausstrich 48 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-	-
Signalausstrich 72 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-	-
Signalausstrich 96 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-	-

Tabelle 24: *Klebsiella pneumoniae*, blutkulturelles Wachstum in Abhängigkeit zur Verdünnungsstufe und Inkubationsdauer

Inkubationsdauer	Verdünnungsstufen					
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
Blutkultur 24 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	Klar
Blutkultur 48 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Blutkultur 72 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Blutkultur 96 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Signalausstrich 24 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 48 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 72 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 96 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-

Tabelle 25: *Salmonella typhimurium*, blutkulturelles Wachstum in Abhängigkeit zur Verdünnungsstufe und Inkubationsdauer

Inkubationsdauer	Verdünnungsstufen					
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
Blutkultur 24 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Blutkultur 48 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Blutkultur 72 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Blutkultur 96 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	klar	klar
Signalausstrich 24 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 48 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 72 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 96 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-

Tabelle 26: *Escherichia coli*, blutkulturelles Wachstum in Abhängigkeit zur Verdünnungsstufe und Inkubationsdauer

Inkubationsdauer	Verdünnungsstufen					
	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹
Blutkultur 24 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb	klar
Blutkultur 48 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb	klar
Blutkultur 72 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb	klar
Blutkultur 96 Stunden	trüb	trüb	trüb	trüb	trüb	klar
Signalausstrich 24 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 48 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 72 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-
Signalausstrich 96 Stunden	nz	nz	nz	nz	-	-

Die Daten aus den Tabellen 22-26 fanden bei der Ermittlung der Nachweisgrenze der Blutkultur Verwendung. Dazu wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten derjenigen Verdünnungsstufen, in denen ein Keimnachweis aus dem Signalaufsatz gelang, als Nachweisgrenze gesetzt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Nachweisgrenze des Blutkulturmediums in Abhängigkeit zur Keimart und Inkubationsdauer

Keimart	Nachweisgrenze in KBE			
	24 h	48 h	72 h	96 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	1	1	1
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	10	1	1	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1	1	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	1	1	1
<i>Escherichia coli</i>	1	1	1	1

Die Werte verdeutlichen, dass bereits 10 KBE am ersten und 1 KBE am zweiten Bebrütungstag ausreichen, um einen positiven Nachweis von *Staphylococcus aureus* und *Arcanobacterium pyogenes* im verwendeten Blutkultursystem führen zu können. Die Nachweisgrenze von *Salmonella typhimurium* (1 KBE), *Klebsiella pneumoniae* (1 KBE) und *Escherichia coli* (1 KBE) zeigen keine Veränderungen infolge der verlängerten Inkubationszeit.

Darüber hinaus kann festgestellt werden, dass eine Trübung des Blutkulturmediums nicht zwangsläufig mit einem positiven Bakteriennachweis aus dem Signalaufsatz einhergeht. So zeigten *Arcanobacterium pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella typhimurium* eine genaue Übereinstimmung des Trübungseffektes und eines anschließenden Nachweises, während bei *Staphylococcus aureus* ein positiver Nachweis bei ungetrübtem Medium und im Falle von *E. coli* auch im Überstand eines getrübten Blutkulturmediums kein Keimnachweis aus dem Signalaufsatz gelang.

4.2.3 Sensitivität des Polymerasekettenreaktion-Nachweises

Zur Ermittlung der Sensitivität des Bakteriennachweises mittels Polymerasekettenreaktion ist eine DNA-Isolation von jeweils 100 µl der

verschiedenen Verdünnungsstufen durchgeführt worden. Anschließend kamen 10 µl der aufbereiteten Probe nach dem in Kapitel 3.2.7 beschriebenen Verfahren zum Einsatz (Tabelle 28).

Der optische Nachweis der DNA-Fragmente erfolgte anschließend mittels Agarosegelelektrophorese (Kapitel 3.2.8.3)

Tabelle 28: Nachweisgrenze der Polymerasekettenreaktion in Abhängigkeit zur jeweiligen Verdünnungsstufe

Keimart	Nachweisbare DNA in der Verdünnungsstufe							
	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	10 ⁻⁹	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹¹	10 ⁻¹²
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-

+ = positiver Nachweis, - = kein Nachweis bakterieller DNA

Anhand der Ausgangskonzentration der Bakterienstammsuspensionen und der Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (Tabelle 28) wurde die Sensitivitätsbestimmung vorgenommen (Tabelle 29).

Tabelle 29: Sensitivitätsgrenze der Polymerasekettenreaktion in KBE

Keimart	Nachweisgrenze (KBE)
<i>Staphylococcus aureus</i>	100

<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	1
<i>Salmonella typhimurium</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10
<i>Escherichia coli</i>	1

Bereits eine KBE erwies sich als ausreichend, um einen positiven Polymerasekettenreaktion-Nachweis von *Arcanobacterium pyogenes*, *Salmonella typhimurium* und *Escherichia coli* zu führen. *Staphylococcus aureus* hingegen konnte erst in einer Verdünnungsstufe mit 100 KBE, *Klebsiella pneumoniae* in einer solchen mit 10 KBE nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Sensitivitätsbestimmung zeigten, dass unter den gegebenen Umständen für einen positiven Nachweis von *Staphylococcus aureus* in der PCR 100 KBE, in der Blutkultur hingegen nur eine KBE erforderlich waren. Auch die Detektion von *Klebsiella pneumoniae* bedarf einer höheren Keimanzahl in der PCR als in dem Blutkulturmedium.

4.3 Kulturelle Blutuntersuchung

Die blutkulturelle Untersuchung der Kälberblutproben erfolgte im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer) der Justus-Liebig Universität in Gießen. Insgesamt wurden 126 Blutkulturen auf mikrobielles Wachstum untersucht.

Die endgültige Befundung erfolgte nach 6-7 Tagen. In dieser Zeit fand eine stetige Inkubation der Blutkulturflaschen bei 37°C statt. Jeden zweiten Tag wurde eine Subkultivierung des Signalaufsatzüberstandes vorgenommen.

Im Zuge der Probenuntersuchung konnten 16 verschiedene Keime aus den Blutkulturen isoliert werden. Im Einzelnen sind diese in Tabelle 30 dargestellt.

Tabelle 30: Ergebnisse der blutkulturellen Untersuchungen der Kälberblutproben

Keimart	Einzelnachweise	Mischkultur	Summe
<i>E. coli</i>	8	0	8
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2	3	5
<i>Enterococcus Species</i>	2	2	4
<i>Acinetobacter Species</i>	1	3	4
α -hämolyisierende Streptokokken	0	2	2
<i>Flavobacterium Species</i>	0	1	1
<i>Pasteurella Species</i>	0	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	0	2
anaerobe gramnegative Stäbchen	1	0	1
aerobe Bazillen	1	0	1
<i>Corynebacterium Species</i>	2	0	2
<i>Micrococcus Species</i>	1	1	2
<i>Neisseria Species</i>	2	1	3
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0	1	1
<i>Pseudomonas Species</i>	5	0	5
Summe	27	15	42

27 Blutkulturen enthielten Keime in Reinkultur. Weitere sechs Blutkulturen wiesen Mischkulturen aus zwei oder drei verschiedenen Bakterien auf.

Der anteilig häufigste Keim in der Blutkultur war *E.coli*. In 24,2% der positiven Blutkulturen wurde dieses Bakterium in Reinkultur nachgewiesen. Mit fünf positiven Einzelnachweisen und somit einem Anteil von 15,2% folgten die

Pseudomonas Species. Die Keime *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* sowie *Enterococcus*, *Corynebacterium* und *Neisseria Species* stellten jeweils einen Anteil von 6% der Einzelnachweise der insgesamt 33 positiven Kulturen.

Acinetobacter Species, anaerobe gramnegative Stäbchen sowie aerobe Bazillen und *Micrococcus Species* konnten jeweils einmal als Reinkultur vorgefunden werden (Tabelle 30).

Die mischkulturellen Nachweise in der Blutkultur erstreckten sich vor allem auf Vertreter der Gattung *Staphylococcus*, α -hämolyisierende Streptokokken, *Enterococcus* und *Acinetobacter Species* (Tabelle 31).

Tabelle 31: Aufschlüsselung der mischkulturellen Bakteriennachweise in 6 Blutkulturen (BK)

Keimart	Blutkulturen mit Mischflora					
	BK 1	BK 2	BK 3	BK 4	BK 5	BK 6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	X				X	X
<i>Enterococcus Species</i>		X	X			
<i>Acinetobacter Species</i>	X	X	X			
α -hämolyisierende Streptokokken	X				X	
<i>Flavobacterium Species</i>			X			
<i>Pasteurella Species</i>				X		
<i>Micrococcus Species</i>				X		
<i>Neisseria Species</i>						X
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>				X		

4.4 Molekularbiologische Blutuntersuchung

Insgesamt wurden 126 Blutproben aufgearbeitet, um eventuell vorhandene bakterielle DNA nachweisen zu können (Kapitel 3.2.6.2). Positive Nachweise gelangen in 57 Fällen in den Leukozyten und 29 mal im Blutplasma. 65 der Proben enthielten weder im Plasma, noch in den Leukozyten Spuren bakterieller DNA. Lediglich 5,8% der Proben zeigten Bakterienanteile im Blutplasma, nicht aber in den Leukozyten (Tabelle 32, Abbildung 4).

Tabelle 32: Ergebnisse des PCR-Nachweises in Plasma und Leukozyten der Kälberblutproben

Leukozyten	Plasma		Summe
	negativ	positiv	
negativ	65	4	69
positiv	32	25	57
Summe	97	29	126*

*20 Reihen haben hierzu unvollständige Daten, da die Tiere vor einer weiteren Probenentnahme nicht mehr zur Verfügung standen.

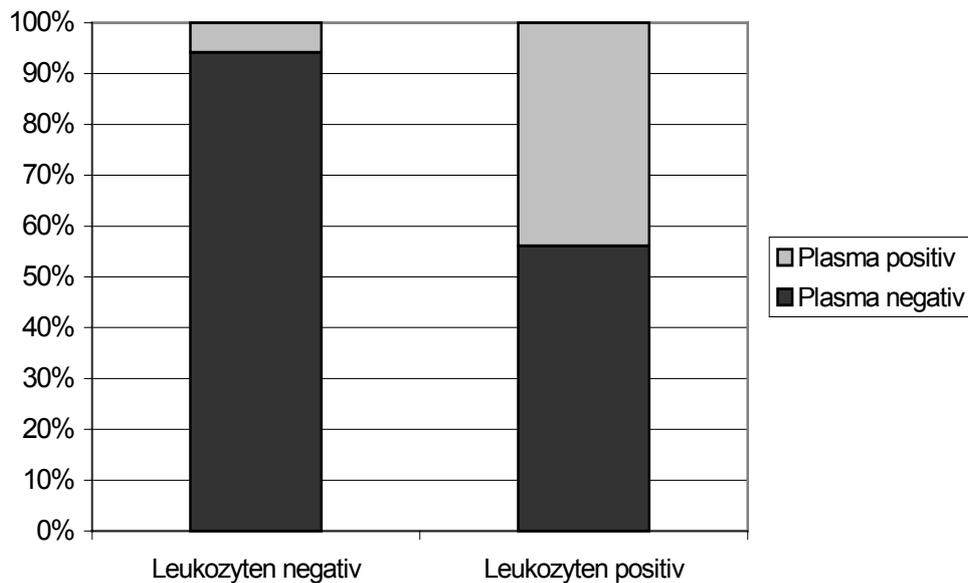


Abbildung 4: Ergebnisse des PCR-Nachweises aus den Leukozyten und dem Blutplasma der erkrankten und der Kontrollkälber

Die statistische Auswertung mittels Chi²- und McNemar-Test zeigte, dass sowohl der Zusammenhang als auch der Unterschied zwischen einem positiven und negativen Bakteriennachweis in den Leukozyten und im Blutplasma signifikant sind (jeweils $p < 0,001$).

Aufgrund des sehr geringen Anteils von Proben mit einem alleinigen Nachweis von Bakterienfragmenten im Blutplasma werden diese im Folgenden gemeinsam ausgewertet. Eine Blutuntersuchung auf Bakterienbestandteile ist dann als positiv anzusehen, wenn im Plasma und oder den Leukozyten ein Nachweis von bakterieller DNA erzielt wurde.

4.5 Klinische Daten und Befunde

4.5.1 Schicksal der Kälber

Retrospektiv wurde das Schicksal der erkrankten Kälber dokumentiert. Dabei zeigte sich deutlich, dass die Überlebensrate der an einer Sepsis erkrankten Tiere niedriger lag, als jene der einzelorganerkrankten Kälber.

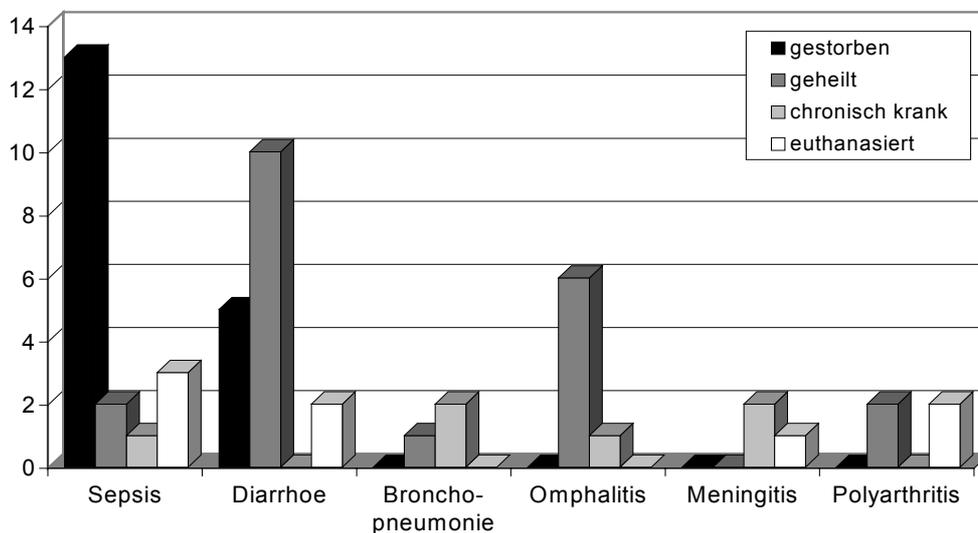


Abbildung 5: Schicksal der erkrankten Kälber in Abhängigkeit zur Diagnose

Insgesamt 16 der 19 Kälber mit einer Sepsis verstarben oder mussten aufgrund der Schwere der Erkrankung und zur Verhinderung weiterer Leiden euthanasiert werden. Nur 3 Tiere überlebten die septische Erkrankung. Die Letalität lag somit bei 84,2%.

Von den 17 an einer schwerwiegenden neonatalen Diarrhoe erkrankten Kälbern konnten 10 Tiere geheilt werden. Zwei Kälber wurden aufgrund der Schwere der

Erkrankung euthanasiert, zwei weitere starben unter der Behandlung. Somit verstarben 41,2% der hochgradig diarrhoeerkrankten Kälber.

Tiere, die an einer hochgradigen Bronchopneumonie erkrankt waren zeigten einen hohen Grad an Chronizität (66,7%). Von den drei an einer Meningitis leidenden Kälbern konnte keines geheilt werden. Zwei zeigten einen chronischen Krankheitsverlauf, das verbleibende wurde euthanasiert. Eine Polyarthritits führte in 50% der Fälle zur Tötung der Kälber, da über den Behandlungszeitraum keine Heilungstendenz festzustellen war. Die verbleibenden 50% zeigten eine Ausheilung der Erkrankung.

In der folgenden Tabelle ist das Schicksal der Probanden in Abhängigkeit zur Diagnose im Einzelnen dargestellt.

Tabelle 33: Schicksal der erkrankten Kälber in Abhängigkeit zur Diagnose

Diagnose	Summe	gestorben	geheilt	chronisch krank	euthanasiert	Letalität
Sepsis	19	13	2	1	3	84,2%
Diarrhoe	17	5	10	0	2	41,2%
Bronchopneumonie	3	0	1	2	0	0,0%
Omphalitis	7	0	6	1	0	0,0%
Meningitis	3	0	0	2	1	33,3%
Polyarthritits	4	0	2	0	2	50,0%
Summe	53	18	21	6	8	49,1%

Der Zusammenhang zwischen den Parametern „Schicksal“ und „Diagnose“ ist statistisch signifikant (Chi²-Test: p<0,05).

4.5.2 Altersverteilung

Das Durchschnittsalter des Kollektives erkrankter Tiere betrug 8,4 Tage. Das Lebensalter der Kälber mit einer Sepsis variierte zwischen 1 und 19 Tagen, mit einer deutlichen Häufung der Erkrankungsfälle in den ersten fünf Lebenstagen.

Zur besseren Veranschaulichung wurden die Werte des Weiteren mittels Box and Whisker-Plot tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 34: Alter, Verteilung von Median, 1. und 3. Quartil (Q_1 , Q_3), Minimum (x_{\min}) und Maximum (x_{\max})

Gruppe	Kontrolle	Sepsis	Omphalitis	Diarrhoe	Broncho- pneumonie	Meningitis	Poly- arthritis
n	20	19	7	17	3	3	4
Median	4	3	7	8	3	10	10,5
x_{\max}	16	19	20	17	21	12	23
x_{\min}	1	1	4	2	1	2	6
Q_1	2,25	2	5	4	1	2	6,25
Q_3	12	10	18	12	21	12	20,75

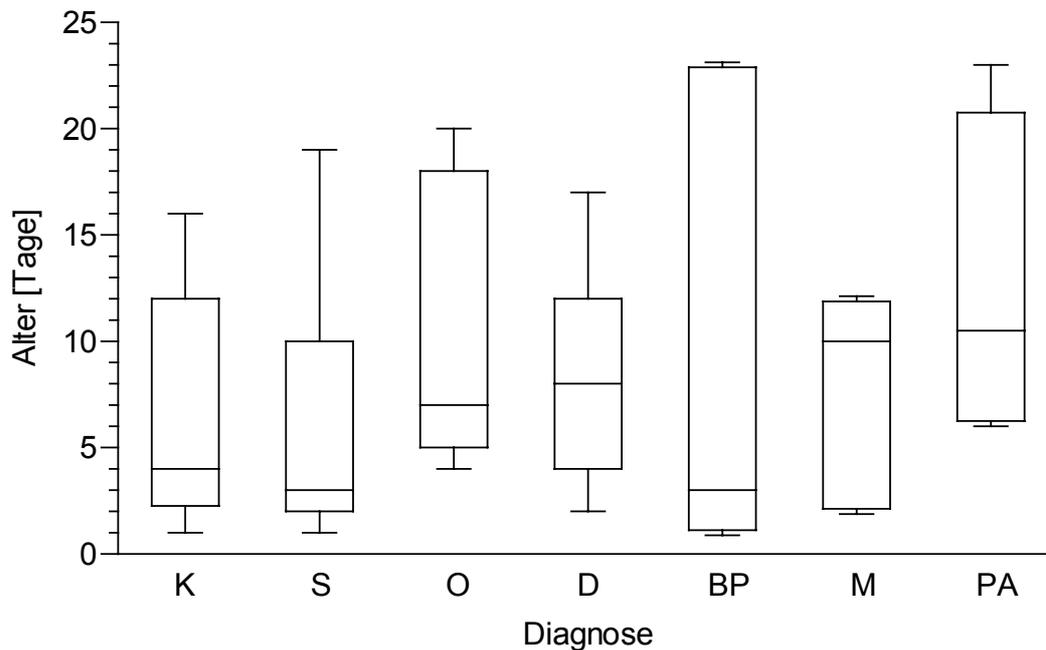


Abbildung 6: Altersverteilung der erkrankten und der Kontrolltiere. Darstellung im Box and Whisker-Plot. K=Kontrolltiere, S=Sepsis, O=Omphalitis, D=Diarrhoe, BP=Bronchopneumonie, M=Meningitis, PA=Polyarthritits

Bei der Betrachtung des Medians ist auffällig, dass 50% der Kälber mit einer Sepsis zwischen einem und drei Tagen alt sind. Gleiches gilt für diejenigen Kälber, die an einer schwerwiegenden Bronchopneumonie litten. Dagegen liegt der Median der nabelkranken Tiere bei 7 und jener diarrhoekranker Kälber bei 8 Tagen. Am höchsten ist der 50% Wert in der Gruppe der Meningitiskälber (10 Tage) und der an einer Polyarthritits leidenden Tiere (10,5 Tage).

4.5.3 Geburtsumstände der Kälber

Um den Einfluss der Geburtsumstände, der Kolostrumaufnahme und der einzelnen klinischen Parameter auf das spätere Schicksal der Kälber zu untersuchen, wurden diese im Folgenden vergleichend ausgewertet.

Tabelle 35: Schicksal der erkrankten und Kontrollkälber in Abhängigkeit von den Geburtsumständen

Schicksal	Summe	Spontan- geburt	leichte KGH	mittel- schwere KGH	schwere KGH	Sectio caesarea
gestorben	18	13	3	0	1	1
geheilt	20	16	1	0	1	2
chronisch krank	7	5	1	0	1	0
euthanasiert	8	5	1	0	1	1
Kontrolltiere	20	9	3	1	1	6
Summe	73	48	9	1	5	10

KGH= konservative Geburtshilfe

Der überwiegende Teil sowohl der Kontrolltiere als auch der erkrankten Tiere entstammte Spontangeburt. Der erhebliche Anteil von Kälbern aus geburtshilflichen Eingriffen in der Kontrollgruppe erklärt sich aus der anteiligen Rekrutierung der Kontrollgruppe aus dem Patientenkollektiv der Klinik.

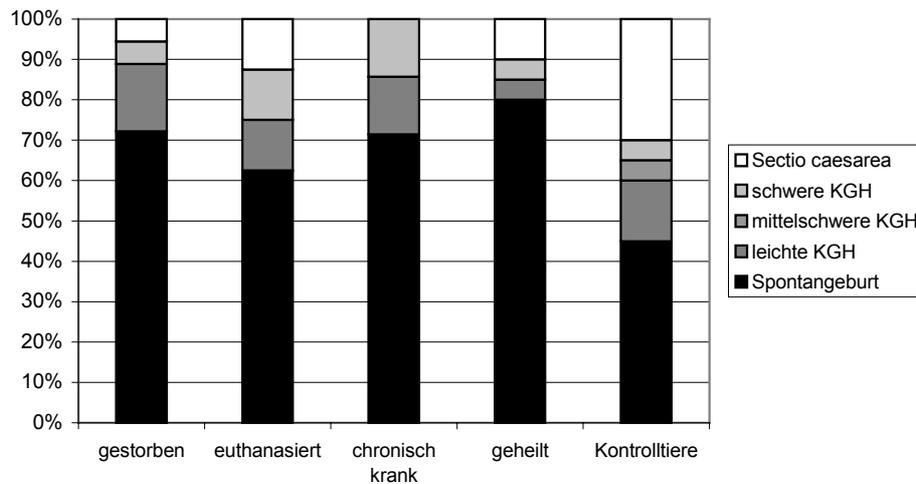


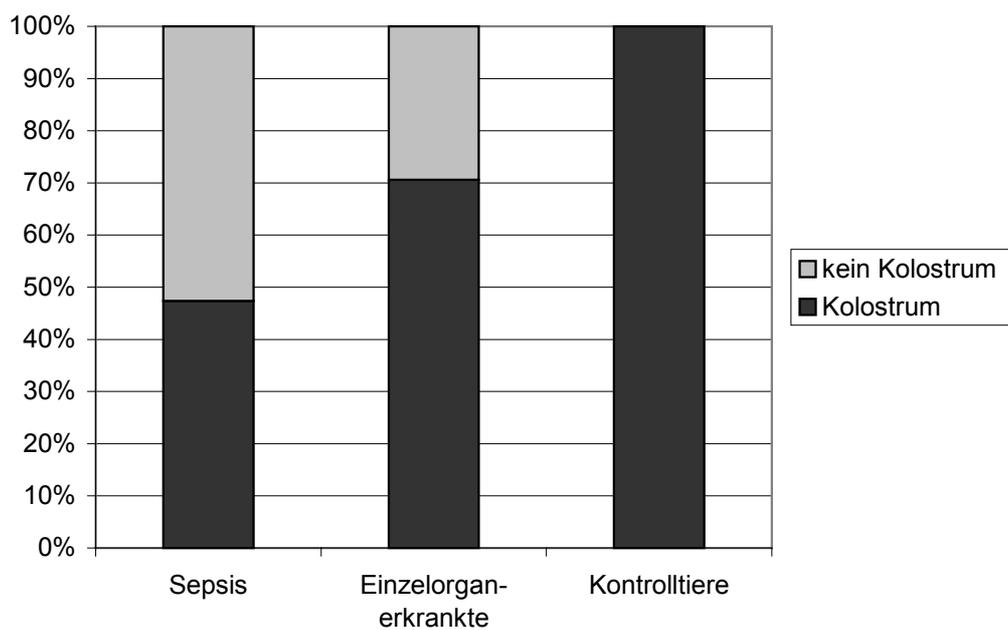
Abbildung 7: Geburtsumstände und Schicksal der Kälber

4.5.4 Kolostralversorgung der Kälber

Lediglich 9 der 19 septisch erkrankten Kälber hatten (vorberichtlich) bereits Kolostrum in ausreichender Menge (4 Liter in den ersten 12 Lebensstunden) aufgenommen. In der Gruppe der einzelorganerkrankten Tiere war dies für 70% der Kälber des zugrunde liegenden Patientenkollektives zutreffend (Tabelle 36, Abbildung 8). Es sei an dieser Stelle noch einmal betont, dass die Daten zur Kolostralversorgung zumeist aus Besitzerauskünften entnommen und somit nicht kontrolliert werden konnten.

Tabelle 36: Diagnose in Abhängigkeit zur Kolostrumaufnahme

Diagnose	Kolostrum erhalten	kein Kolostrum erhalten	Summe
Sepsis	9	10	19
Omphalitis	7	0	7
Diarrhoe	13	4	17
Bronchopneumonie	1	2	3
Meningitis	2	1	3
Polyarthritits	1	3	4
Kontrolltiere	20	0	20
Summe	53	20	73

**Abbildung 8:** Diagnose der Kälber und Status der Kolostralversorgung

4.5.5 Klinische Befunde

Jedes Kalb wurde vor der Probenentnahme einer eingehenden klinischen Untersuchung unterzogen. Dabei fanden folgende Parameter Berücksichtigung:

Allgemeinbefinden, Pulsfrequenz, Atemfrequenz, rektal gemessene Körpertemperatur, Beurteilung der Kopfschleimhäute sowie Zustand und Anzahl der Episkleralgefäße, der Saugreflex, der Schluckreflex (Beurteilung bei der Tränkeaufnahme), Lungenauskultation, Nabelsituation, Zustand der Gelenke und die Kotkonsistenz. Resultierend aus der Gesamtheit der klinischen Untersuchungsbefunde erfolgte die Diagnosestellung.

4.5.5.1 Pulsfrequenz

Die quantitativen Variablen Puls, Atmung und Temperatur wurden durch die Beschreibung der Extremwerte und des Medians mittels Box and Whisker-Plot tabellarisch und graphisch dargestellt.

Tabelle 37: Pulsfrequenz pro Minute, Verteilung von Median, 1. und 3. Quartil (Q_1 , Q_3), Minimum (x_{\min}) und Maximum (x_{\max})

Gruppe	Kontrolle	Sepsis	Omphalitis	Diarrhoe	Broncho- pneumonie	Meningitis	Poly- arthritis
n	20	19	7	17	3	3	4
Median	125	120	112	120	120	104	104
x_{max}	142	160	160	160	132	120	130
x_{min}	88	72	76	72	80	93	98
Q₁	119	104	90	100	80	93	98,5
Q₃	133	136	160	138	132	120	125

Die Tabelle zeigt, dass insgesamt gesehen die Pulsfrequenz im Wertebereich zwischen 72 und 160 Schlägen pro Minute angesiedelt ist. Die größte Streuung ist in den Gruppen „Sepsis“, „Omphalitis“ und „Diarrhoe“ vorhanden, während in den verbleibenden Gruppen, vor allem in der Kontrollgruppe, enger gruppierte Werte gemessen wurden.

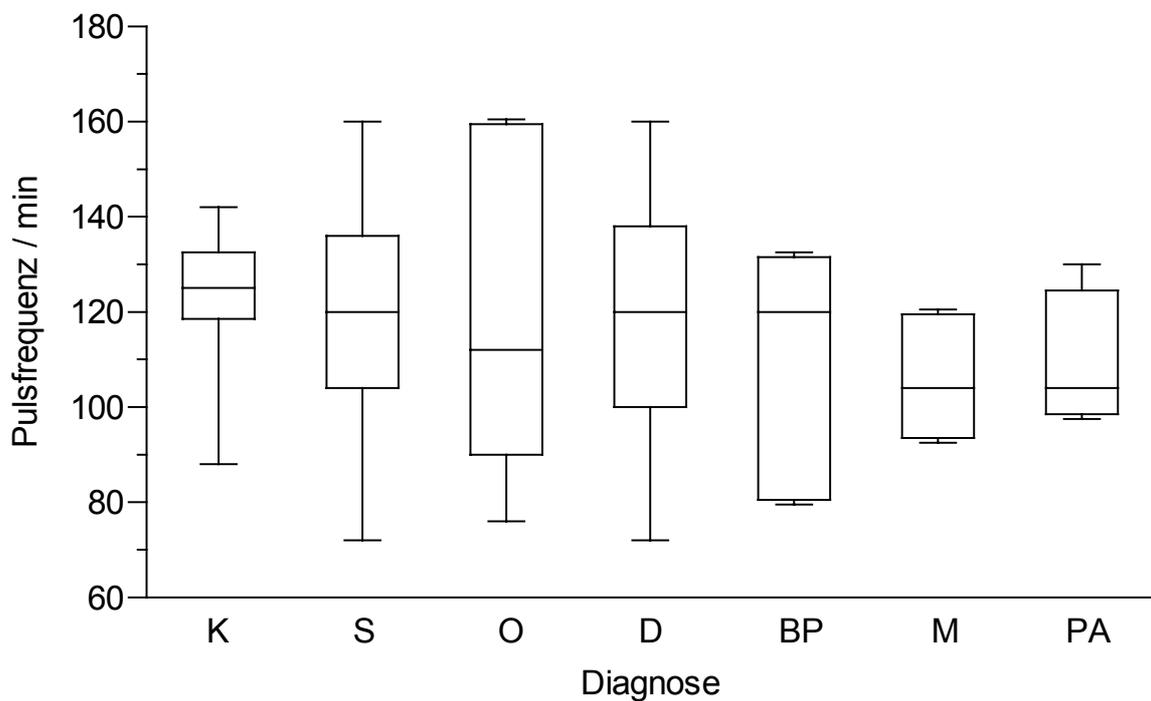


Abbildung 9: Pulsfrequenz pro Minute der erkrankten und der Kontrolltiere. Darstellung im Box and Whisker-Plot. K=Kontrolltiere, S=Sepsis, O=Omphalitis, D=Diarrhoe, BP=Bronchopneumonie, M=Meningitis, PA=Polyarthrititis

4.5.5.2 Atemfrequenz

Die Auswertung der Medianwerte der verschiedenen Probandengruppen erbrachte, dass 50% der Gesamtkälber eine Atemfrequenz zwischen 36 und 55 Zügen pro Minute aufwiesen.

Tabelle 38: Atemfrequenz pro Minute, Verteilung von Median, 1. und 3. Quartil (Q_1 , Q_3), Minimum (x_{\min}) und Maximum (x_{\max})

Gruppe	Kontrolle	Sepsis	Omphalitis	Diarrhoe	Broncho- pneumonie	Meningitis	Poly- arthritis
n	20	19	7	17	3	3	4
Median	47	44	48	40	44	36	55
x_{\max}	80	104	62	56	56	40	68
x_{\min}	36	24	32	12	44	28	40
Q_1	42	34	41	29	44	28	42
Q_3	58	48	60	49	56	40	67

Die Maximum-Minimum-Bewertung verdeutlicht auch hier die Inhomogenität der einzelnen Gruppen. Die mit Abstand größte Wertespanne zeigt die Gruppe septisch erkrankter Tiere mit Werten zwischen 24 und 104 Atemzügen pro Minute.

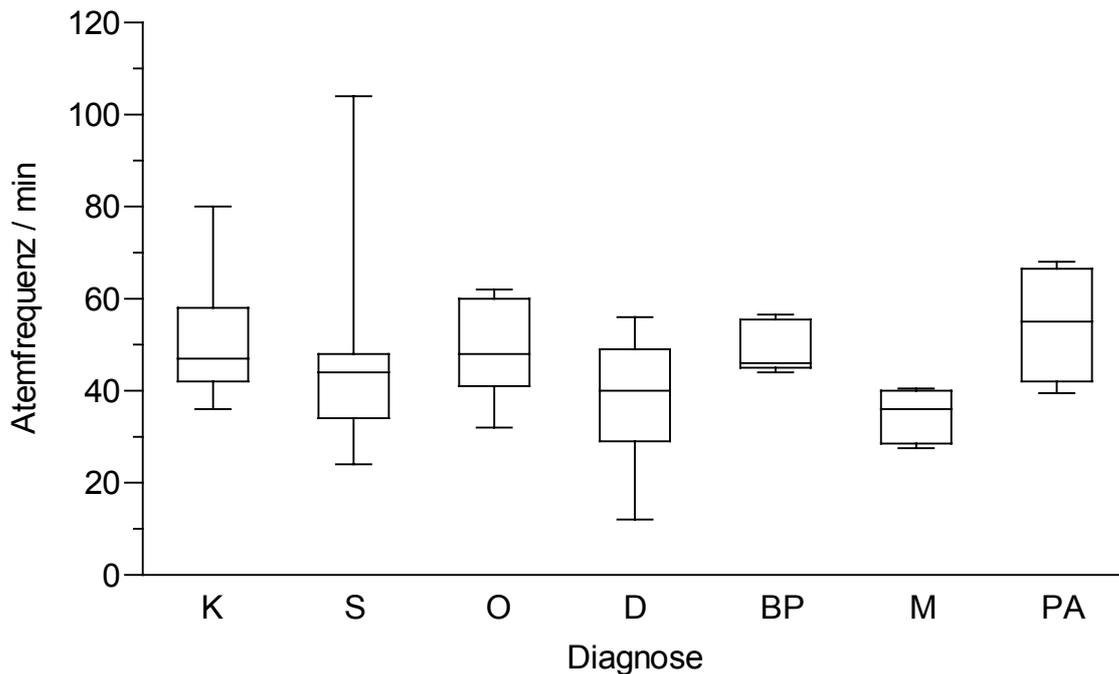


Abbildung 10: Atemfrequenz pro Minute der erkrankten und der Kontrolltiere. Darstellung im Box and Whisker-Plot. K=Kontrolltiere, S=Sepsis, O=Omphalitis, D=Diarrhoe, BP=Bronchopneumonie, M=Meningitis, PA=Polyarthritits

4.5.5.3 Körperinnentemperatur

Die Körperinnentemperatur der Kontrollgruppe betrug im Mittel 38,5 °C und bewegte sich in Streuungsgrenzen zwischen 37,8 und 39,1°C. Erheblich größere Temperaturdivergenzen waren in den Gruppen „Sepsis“ und „Diarrhoe“ zu verzeichnen. Beide Gruppen zeigten einen Mittelwert unterhalb von 38,0°C. Die Streuung der Temperaturwerte dieser beiden Gruppen war mit Werten von 34,7 und 33,1 bis 39,9 und 40,2 erheblich. Die verbleibenden Gruppen („Omphalitis“, „Bronchopneumonie“, „Meningitis“ und „Polyarthritits“) zeigten weniger drastische Streuungen der Temperaturwerte.

Tabelle 39: Körpertemperatur in °Celsius, Verteilung von Median, 1. und 3. Quartil (Q₁, Q₃), Minimum (x_{min}) und Maximum (x_{max})

Gruppe	Kontrolle	Sepsis	Omphalitis	Diarrhoe	Broncho- pneumonie	Meningitis	Poly- arthritis
n	20	19	7	17	3	3	4
Median	38,4	38,8	39,5	38,0	39,5	38,8	39,3
x_{max}	39,1	39,9	40,9	40,2	39,7	39,6	39,8
x_{min}	37,8	34,7	38,6	33,1	37,5	38,4	39,0
Q₁	38,2	37,0	39,1	35,8	37,5	38,4	39,1
Q₃	38,8	39,1	39,8	39,6	39,7	39,6	39,7

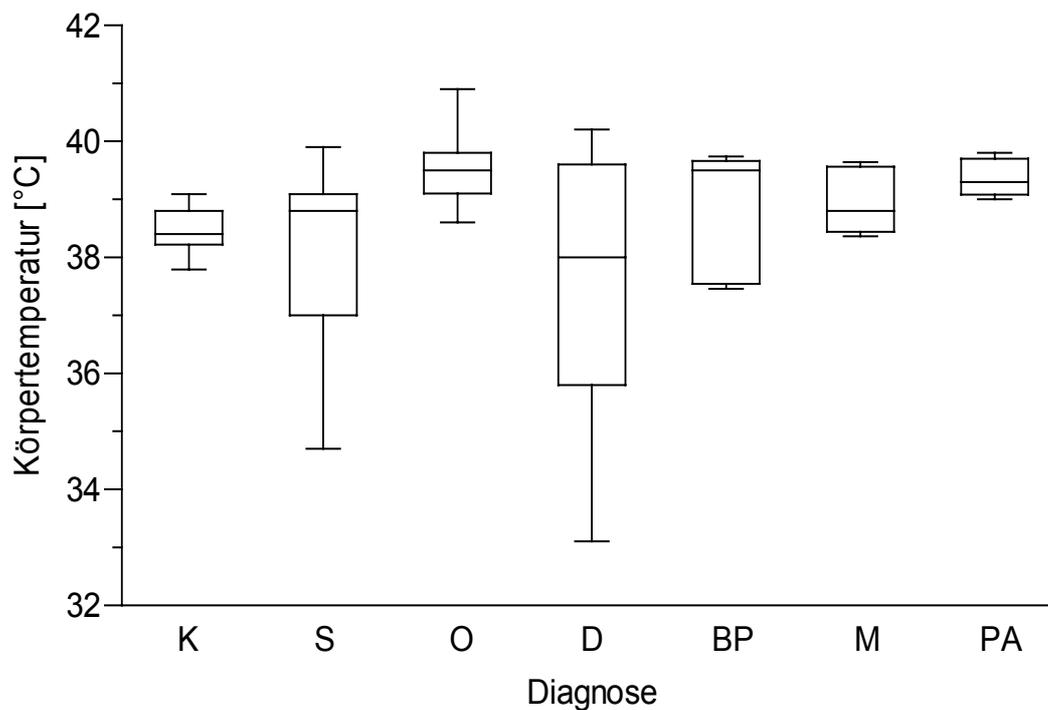


Abbildung 11: Körpertemperatur (°C) der erkrankten und der Kontrolltiere. Darstellung im Box and Whisker-Plot. K=Kontrolltiere, S=Sepsis, O=Omphalitis, D=Diarrhoe, BP=Bronchopneumonie, M=Meningitis, PA=Polyarthritis

4.6 Labordiagnostische Befunde

4.6.1 Gesamtproteingehalt des Blutes

Da eine angenäherte Normalverteilung vorlag (Variationskoeffizient $< 0,4$), erfolgte die Beschreibung der Daten mittels arithmetischer Mittelwerte (\bar{x}) und Standardabweichungen ($\pm s$).

Innerhalb der unterschiedlichen Schicksalsgruppen waren deutliche Schwankungen bezüglich der mittleren Höhe des Gesamtproteingehaltes des Blutes zu erkennen. Die größte Konstanz lag in der Gruppe der Kontrolltiere mit einem Mittelwert von 56,4 g/l bei einer einfachen Standardabweichung von 5,0 vor. Der Gesamtproteingehalt des Blutes betrug in der Gruppe der gestorbenen Tiere im Mittel 50,0 g/l, während in der Gruppe der chronisch kranken und euthanasierten Tiere durchschnittliche Werte von 54,8 und 50,9 g/l ermittelt werden konnten. Die niedrigsten Werte wies die Gruppe der geheilten Tiere auf (46,8 g/l).

Tabelle 40: Gesamtproteingehalt des Kälberblutes (n , \bar{x} , $\pm s$) in g/l in Bezug zum Schicksal der Tiere

Gruppe	gestorben	geheilt	chronisch krank	euthanasiert	gesunde Kontrolltiere
n	18	20	6	7	20
\bar{x}	50,0	46,8	54,8	50,9	56,4
$\pm s$	7,4	8,2	7,5	6,4	5,0

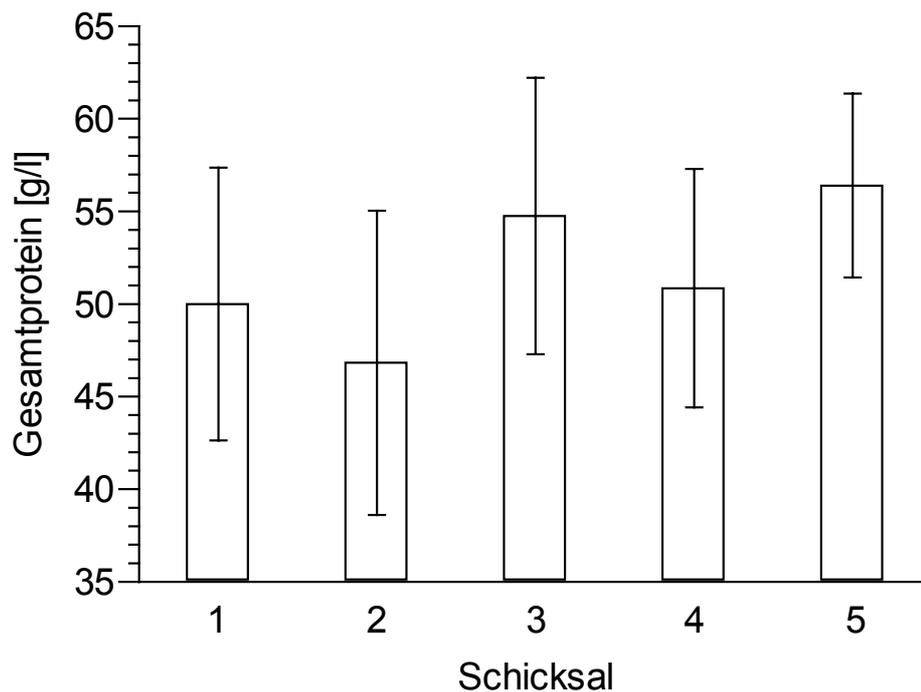


Abbildung 12: Gesamtproteingehalt des Blutes (g/l) der in Bezug zum Schicksal der Kälber. Darstellung der Mittelwerte (\bar{x}) und der Standardabweichung ($\pm s$). 1= gestorben, 2= geheilt, 3=chronisch krank, 4= euthanasiert, 5= Kontrolltiere.

4.6.2 Leukozytengesamtzahl des Blutes

Die Messung der Leukozytengesamtzahl erfolgte mit Hilfe des automatischen Analysesystems Cell-Dyn 3500[®] unmittelbar nach Entnahme der Blutprobe.

In der Gruppe der Kälber mit einer klinischen Sepsis zeigen 50% der Tiere Leukozytenzahlen von 0,7 G/l bis 6,88 G/l. 25% der betroffenen Tiere (1. Quartil) wiesen sogar Werte auf, die deutlich unterhalb des Minimalwertes aller anderen Tiere, ausgenommen der Diarrhoegruppe, angesiedelt waren. In dem 4. Quartil der Sepsiskälber konnten Werte mit erheblichen Streuungen (zwischen 13,3 und 43,3 G/l) gemessen werden. Höhere oder niedrigere Leukozytenwerte wurden in keiner anderen Gruppe verzeichnet.

Tabelle 41: Leukozytengesamtzahl (G/l), Verteilung von Median, 1. und 3. Quartil (Q₁, Q₃), Minimum (x_{min}) und Maximum (x_{max})

Gruppe	Kontrolle	Sepsis	Omphalitis	Diarrhoe	Broncho- pneumonie	Meningitis	Poly- arthritis
n	20	19	7	17	3	3	4
Median	8,1	6,9	16	11,5	26,1	6,8	5,6
x_{max}	18,7	43,3	30,5	37,1	35,4	8,5	6,5
x_{min}	4,4	0,7	5,1	1,1	4,8	4,6	5,0
Q₁	6,9	3,4	5,6	4,7	4,8	4,6	5,1
Q₃	11,4	13,3	25	15,9	35,4	8,5	6,3

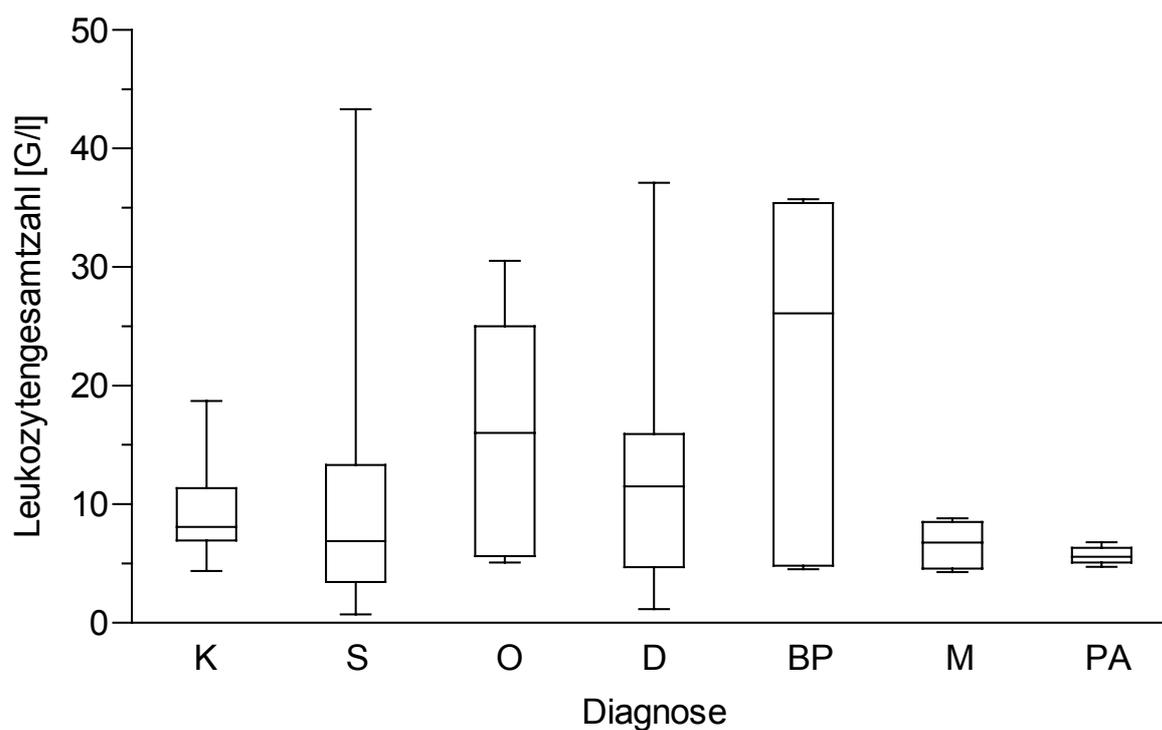


Abbildung 13: Leukozytengesamtzahl (G/l) der erkrankten und der Kontrolltiere (G/l). Darstellung im Box and Whisker-Plot. K=Kontrolltiere, S=Sepsis, O=Omphalitis, D=Diarrhoe, BP=Bronchopneumonie, M=Meningitis, PA=Polyarthritis

Zur Prüfung der Schicksalhaftigkeit einer Leukozytenzählung wurde diese im Folgenden dem Schicksal der Kälber gegenübergestellt. Es zeigte sich, dass fast 25% der gestorbenen Tiere Werte unterhalb der Minimalwerte der restlichen Gruppen aufwiesen. Die Leukozytenzahl der geheilten Tiere hingegen bewegte sich in weiten Grenzen zwischen 2,44 und 30,5 G/l.

Tabelle 42: Leukozytengesamtzahl (G/l) und Schicksal der Kälber, Verteilung von Median, 1. und 3. Quartil (Q_1 , Q_3), Minimum (x_{\min}) und Maximum (x_{\max})

Gruppe	gestorben	geheilt	chronisch krank	euthanasiert	gesunde Kontrolltiere
n	20	19	7	17	3
Median	6,69	12,5	8,5	6,6	8,08
x_{max}	37,1	30,5	35,4	43,3	18,7
x_{min}	0,7	2,44	4,56	3,43	4,36
Q₁	2,53	5,32	4,8	5,29	6,93
Q₃	15,8	19,5	24,8	10,9	11,4

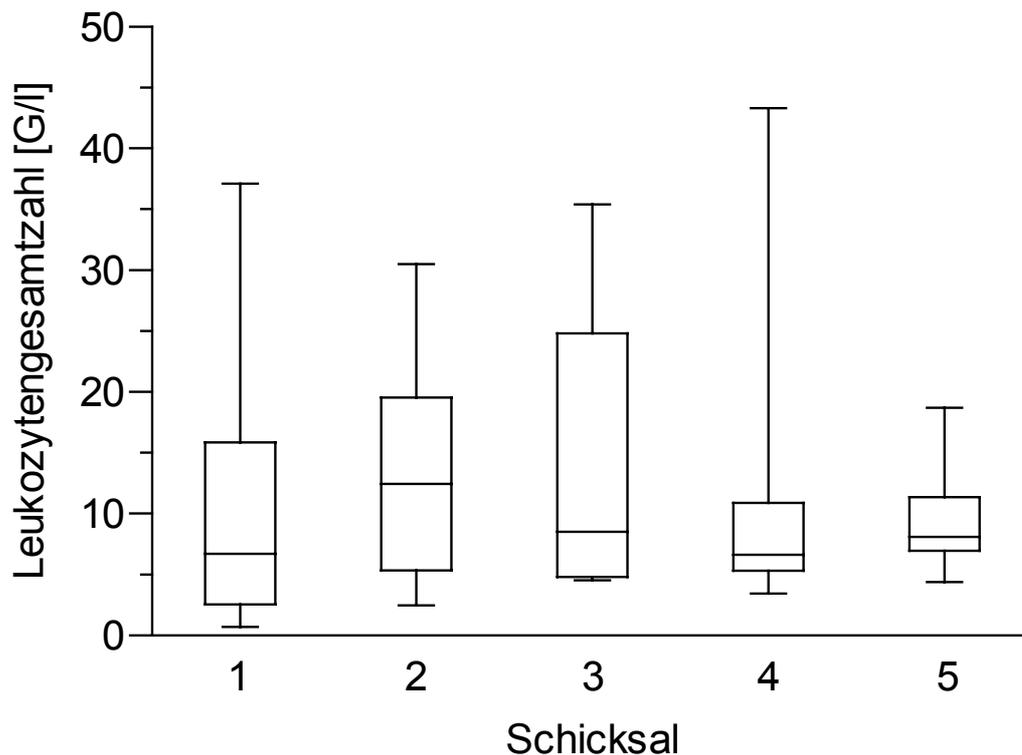


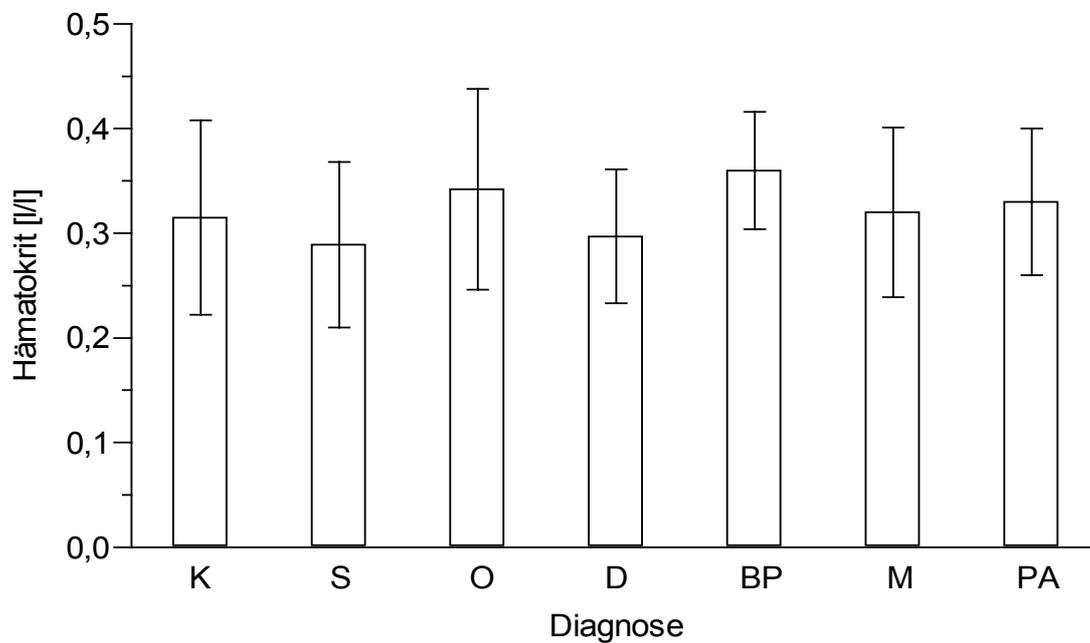
Abbildung 14: Leukozytengesamtzahl des Blutes (G/l) in Bezug zum Schicksal der Kälber. Darstellung im Box and Whisker-Plot. 1= gestorben, 2= geheilt, 3=chronisch krank, 4= euthanasiert, 5= Kontrolltiere.

4.6.3 Hämatokrit

Bei Betrachtung der mittleren Hämatokritwerte der einzelnen Gruppen wird deutlich, dass septisch erkrankte Tiere insgesamt gesehen die niedrigsten Werte aufwiesen ($\bar{x}=0,29$, $\pm s=0,093$), dicht gefolgt von den an einer schwerwiegenden Diarrhoe leidenden Tieren ($\bar{x}=0,30$, $\pm s=0,064$). Die höchsten durchschnittlich gemessenen Werte lagen bei Tieren mit einer Nabel- oder Lungenerkrankung vor ($\bar{x}=0,34$ und $0,36$, $\pm s=0,096$ und $0,056$). Die Messwerte der Kontrolltiere ergaben im Mittel $0,32$ l/l bei einer einfachen Standardabweichung von $0,093$.

Tabelle 43: Hämatokrit (l/l) der erkrankten und der Kontrolltiere (n, \bar{x} , $\pm s$)

Gruppe	Kontrolle	Sepsis	Omphalitis	Diarrhoe	Broncho- pneumonie	Meningitis	Poly- arthritis
n	20	19	7	17	3	3	4
\bar{x}	0,32	0,29	0,34	0,30	0,36	0,32	0,33
$\pm s$	0,093	0,079	0,096	0,064	0,056	0,081	0,07

**Abbildung 15:** Hämatokrit (l/l) des Blutes in Bezug zur Diagnose der Kälber. Darstellung der Mittelwerte (\bar{x}) und der Standardabweichung ($\pm s$). K=Kontrolltiere, S=Sepsis, O=Omphalitis, D=Diarrhoe, BP=Bronchopneumonie, M=Meningitis, PA=Polyarthritis

4.7 Methodenvergleich

Um die Aussagekraft der PCR-Ergebnisse mit jener der Blutkulturen vergleichen zu können, wurde lediglich die quantitative Aussage der Blutkultur herangezogen. Das bedeutet, dass jeder Keimnachweis ohne Bewertung und Berücksichtigung der Art und Anzahl der nachgewiesenen Keime in einer der zwei untersuchten Proben als ein positives Ergebnis gewertet wurde. Bezüglich des PCR-Nachweises stellte ein positives Ergebnis im Blutplasma oder in den Leukozyten in einer der zwei untersuchten Proben einen positiven Nachweis dar.

Tabelle 44: Ergebnisse des PCR-Nachweises und der blutkulturellen Untersuchung der Gesamtblutproben

PCR	Blutkultur		Summe
	negativ	positiv	
negativ	60	5	65
positiv	33	28	61
Summe	93	33	126

In Abbildung 16 ist die prozentuale Verteilung der Gesamtheit der positiven und negativen Nachweise der PCR und der blutkulturellen Untersuchung dargestellt.

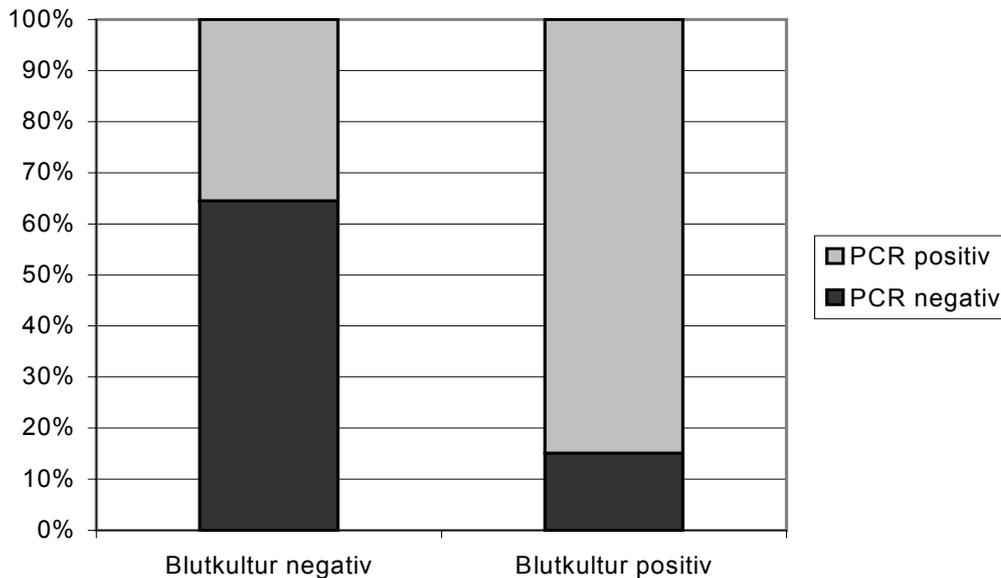


Abbildung 16: Prozentuale Verteilung der Gesamtergebnisse der blutkulturellen Untersuchungen und der PCR-Nachweise

Von den insgesamt 126 untersuchten Proben zeigten 60 sowohl in der Blutkultur als auch in der PCR keinen Bakteriennachweis. Das positive Ergebnis von Blutkultur und PCR stimmte bei 28 Blutproben (69,8%) überein. Das positive Blutkulturergebnis von 5 Proben wurde nicht durch die PCR-Untersuchung bestätigt, woraus sich ein prozentualer Anteil von 4,0% ergibt. Jedoch konnte in 33 (26,2%) weiteren Proben bakterielle DNA mittels PCR entdeckt werden, welche nicht im Stande waren Bakterienwachstum in der Blutkultur auszulösen.

Die Auswertung der Vierfeldertafel mittels Chi²- und McNemar-Test bestätigte, dass sowohl der Zusammenhang als auch der Unterschied zwischen dem Ergebnis des Bakteriennachweises mittels Polymerasekettenreaktion und Blutkultur signifikant sind (jeweils $p < 0,001$).

Die Gegenüberstellung des Schicksals und der Diagnose der Kälber mit einem positiven Blutkulturergebnis ermöglicht eine genauere Beurteilung, ob es sich um wahr oder falsch positive Ergebnisse handelt.

Tabelle 45: Beurteilung der PCR-Ergebnisse blutkulturpositiver Kälber (Einzelnachweise) unter Berücksichtigung der Diagnose und des Schicksals

Ergebnis der Blutkultur	Diagnose	PCR	Schicksal	Beurteilung
<i>Escherichia coli</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Escherichia coli</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Escherichia coli</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Escherichia coli</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Escherichia coli</i>	Sepsis	+	gestorben nach 6 Tagen	wahr positiv
<i>Escherichia coli</i>	Broncho-pneumonie	+	chronisch krank entlassen nach 11 Tagen	wahr positiv
<i>Escherichia coli</i>	Diarrhoe	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Escherichia coli</i>	Diarrhoe	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sepsis	+	euthanasiert nach 8 Tagen	wahr positiv
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Kontrolltier	-	gesundes Kontrolltier	wahr negativ
<i>Acinetobacter Species</i>	Omphalitis	+	geheilt durch Operation	wahr positiv
<i>Enterococcus Species</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Enterococcus Species</i>	Sepsis	+	euthanasiert nach 14 Tagen	wahr positiv
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Diarrhoe	-	geheilt nach 6 Tagen	wahr positiv
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Diarrhoe	+	geheilt nach 6 Tagen	wahr positiv

Ergebnis der Blutkultur	Diagnose	PCR	Schicksal	Beurteilung
aerobe Bazillen	Diarrhoe	-	geheilt nach 8 Tagen	unklar
<i>Corynebacterium Species</i>	Broncho-pneumonie	+	geheilt nach 8 Tagen	unklar
<i>Corynebacterium Species</i>	Diarrhoe	-	chronisch krank entlassen nach 14 Tagen	unklar
<i>Micrococcus Species</i>	Meningitis	+	euthanasiert nach 11 Tagen	wahr positiv
<i>Neisseria Species</i>	Omphalitis	-	geheilt nach 7 Tagen	unklar
<i>Neisseria Species</i>	Meningitis	+	euthanasiert nach 11 Tagen	wahr positiv
<i>Pseudomonas Species</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Pseudomonas Species</i>	Diarrhoe	+	geheilt nach 5 Tagen	wahr positiv
<i>Pseudomonas Species</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Pseudomonas Species</i>	Diarrhoe	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Pseudomonas Species</i>	Diarrhoe	+	geheilt nach 8 Tagen	wahr positiv

Die Ergebnisse zeigen, dass nur eine Blutkultur als eindeutig falsch positiv und die PCR-Probe somit als wahr negativ angesehen werden kann, da es sich bei dem betroffenen Kalb um ein gesundes Kontrolltier gehandelt hat. Da der nachgewiesene *Staphylococcus intermedius* nicht durch die PCR erfasst wurde, ist es als wahrscheinlich zu erachten, dass im Zuge der Übertragung der Blutprobe in das Blutkulturmedium eine Kontamination stattgefunden hat. Andere Fälle hingegen wurden als unklar eingestuft, da unspezifische Keime nachgewiesen wurden und die schnelle klinische Besserung der Tiere gegen einen septischen Krankheitsverlauf sprechen. Da jedoch eine passagere Bakteriämie nicht ausgeschlossen ist, wurden auch die unklaren Befunde als „wahr positiv“ gewertet.

Der Nachweis mischkultureller Infektionen wird im Allgemeinen als Kontamination angesehen. Aus diesem Grund seien auch diese Ergebnisse genauer betrachtet.

Tabelle 46: Beurteilung der PCR-Ergebnisse mischkulturell positiver Kälber unter Berücksichtigung des Schicksals und der Diagnose

Ergebnis der Blutkultur	Diagnose	PCR	Schicksal	Beurteilung
<i>Staph. epidermidis</i> <i>Acinetobacter Species</i> α -hämolyisierende Strep.	Sepsis	+	euthanasiert nach 7 Tagen	wahr positiv
<i>Enterococcus Species</i> <i>Acinetobacter Species</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Enterococcus Species</i> <i>Acinetobacter Species</i> <i>Flavobacterium Species</i>	Diarrhoe	+	geheilt nach 30 Tagen	wahr positiv
<i>Pasteurella Species</i> <i>Micrococcus Species</i> <i>Arc. pyogenes</i>	Sepsis	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
<i>Staph. epidermidis</i> α -häm. Streptokokken	Sepsis	+	euthanasiert nach 14 Tagen	wahr positiv
<i>Staph. epidermidis</i> <i>Neisseria Species</i>	Diarrhoe	+	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv

Alle betroffenen Kälber mit mischkulturellen Nachweisen litten an schwerstwiegenden Erkrankungen, so dass diese Mischkulturen als Folge der Schwere der Erkrankung und somit als „wahr positiv“ gewertet werden.

Somit beträgt die Kontaminationsrate der Blutkultur auf Grundlage der in dieser Arbeit erhobenen Daten 3%.

Zur Beurteilung der blutkulturnegativen und PCR-positiven Proben ist auch hier eine Einzelbetrachtung notwendig.

Tabelle 47: Beurteilung der PCR-positiven und blutkulturnegativen Ergebnisse unter Berücksichtigung des Schicksals und der Diagnose

Diagnose	Schicksal	Beurteilung
Sepsis	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
Sepsis	euthanasiert am gleichen Tag	wahr positiv
Omphalitis	geheilt nach 25 Tagen	wahr positiv
Omphalitis	geheilt nach 24 Tagen	wahr positiv
Omphalitis	geheilt nach 6 Tagen	unklar
Diarrhoe	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
Omphalitis	geheilt nach 12 Tagen	unklar
Diarrhoe	geheilt nach 9 Tagen	unklar
Sepsis	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
Omphalitis	geheilt nach 10 Tagen	unklar
Meningitis	chronisch krank entlassen nach 14 Tagen	wahr positiv
Sepsis	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
Diarrhoe	geheilt nach 5 Tagen	unklar
Diarrhoe	geheilt nach 5 Tagen	unklar
Omphalitis	chronisch krank entlassen nach 18 Tagen	wahr positiv
Sepsis	chronisch krank entlassen nach 13 Tagen	wahr positiv
Sepsis	chronisch krank entlassen nach 12 Tagen	wahr positiv
Sepsis	gestorben nach 15 Tagen	wahr positiv
Sepsis	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
Diarrhoe	geheilt nach 30 Tagen	wahr positiv
Diarrhoe	geheilt nach 30 Tagen	wahr positiv
Bronchopneumonie	chronisch krank entlassen nach 14 Tagen	unklar
Bronchopneumonie	chronisch krank entlassen nach 11 Tagen	unklar
Diarrhoe	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
Diarrhoe	geheilt nach 12 Tagen	unklar
Polyarthritits	euthanasiert nach 6 Tagen	wahr positiv
Polyarthritits	euthanasiert nach 6 Tagen	wahr positiv
Sepsis	geheilt nach 16 Tagen	wahr positiv
Sepsis	gestorben am gleichen Tag	wahr positiv
Diarrhoe	geheilt nach 9 Tagen	unklar
Kontrolltier	Kontrolltier	falsch positiv
Kontrolltier	Kontrolltier	falsch positiv
Kontrolltier	Kontrolltier	falsch positiv

Die positiven Ergebnisse der drei Kontrolltiere können als falsch positive Messungen gewertet werden. Andere Fälle hingegen gestalten sich problematischer, so dass eine objektive Einstufung nicht durchführbar erscheint. Lediglich anhand der klinischen Entwicklung kann angenommen werden, ob ein Bakteriengehalt in der Blutprobe zum Untersuchungszeitraum wahrscheinlich war.

Auch hier werden parallel zur Beurteilung fraglicher Blutkulturbefunde unklare Ergebnisse als „wahr positiv“ gewertet. Die falsch-positiv-Rate des PCR-Nachweises beträgt somit 4,9%

4.7.1 Einfluss antibiotischer Behandlungen der Kälber auf das Ergebnis des Bakteriennachweises mittels PCR und Blutkultur

Da bei einem Großteil der Kälber vor Einlieferung in die Klinik bereits eine antibiotische Behandlung erfolgt war, erforderte dies vorerst eine getrennte Betrachtung dieser Proben von jenen ohne den Einfluss antimikrobiell wirksamer Substanzen.

4.7.1.1 Überprüfung der Blutproben von Kälbern ohne vorherige antibiotische Behandlung

Unter alleiniger Berücksichtigung der Blutproben nicht antibiotisch vorbehandelter Kälber ergeben sich die in den folgenden Tabellen wiedergegeben Übereinstimmungen zwischen den beiden Untersuchungsmethoden.

Tabelle 48: Ergebnisse des PCR-Nachweises und der blutkulturellen Untersuchung aus Blutproben ohne antibiotischen Einfluss

PCR	Blutkultur		Summe
	negativ	positiv	
negativ	30	2	32
positiv	10	10	20
Summe	40	12	52

Die bakteriologisch negativen Ergebnisse der PCR stimmten in 93,75% der Proben mit dem der Blutkultur überein. Nur zwei der 32 Blutproben, welche einen Anteil von 6,25% darstellen, zeigten eine positive Blutkultur und ein negatives PCR-Resultat. Dagegen findet der Positivnachweis der PCR nur bei 50% der Proben Bestätigung durch das Ergebnis der Blutkultur.

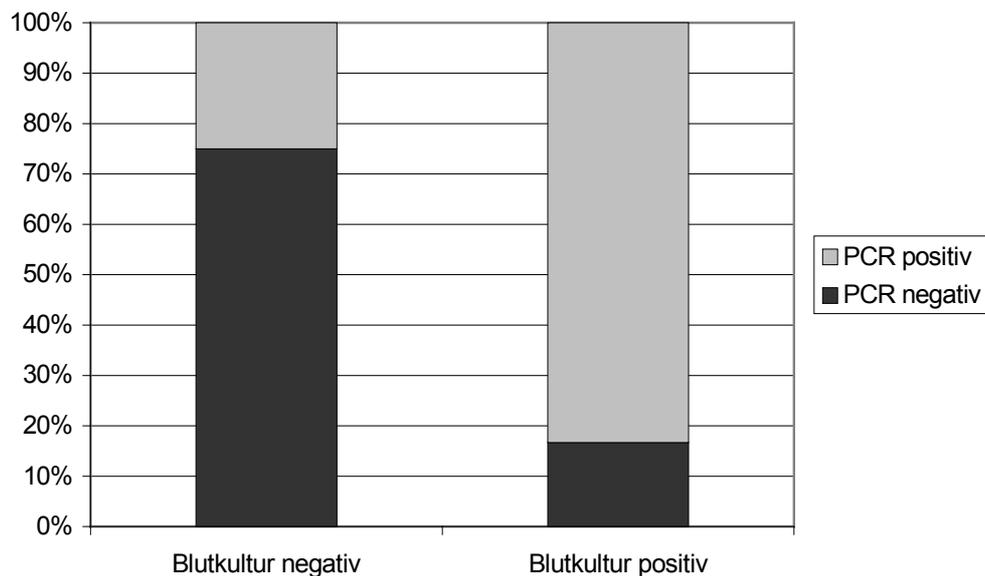


Abbildung 17: Ergebnisse des PCR- und blutkulturellen Bakteriennachweises aus Blutproben ohne antibiotischen Einfluss

Die prozentuale Betrachtung der Gesamtbilanz in Bezug auf das Ergebnis der Blutkultur verdeutlicht, dass bei 25% der blutkulturell negativen Proben ein Nachweis bakterieller DNA mittels PCR erfolgte, hingegen bei einem Anteil von 16,7% das Blutkulturergebnis nicht durch das der PCR Bestätigung fand (Abbildung 17).

Die Ergebnisse des Bakteriennachweises mittels Polymerasekettenreaktion und Blutkultur zeigten einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,001$) und Unterschied ($p < 0,05$) bei den Blutproben von Kälbern ohne vorherige antibiotische Behandlung.

4.7.1.2 Überprüfung der Blutproben von Kälbern mit vorheriger antibiotischer Behandlung

Die Negativergebnisse der PCR zeigten auch hier eine ähnlich hohe Übereinstimmung (88,5%). Der positive Nachweis von Bakterien mittels PCR wurde jedoch nur in 43,9% der untersuchten Blutproben ohne antibiotischen Einfluss durch das Ergebnis der Blutkultur bestätigt. 23 der Proben (46,1%) wiesen einen positiven PCR-Nachweis und ein negatives Blutkulturergebnis auf.

Tabelle 49: Ergebnisse des PCR- und blutkulturellen Bakteriennachweises mit antibiotischem Einfluss

PCR	Blutkultur		Summe
	negativ	positiv	
negativ	23	3	26
positiv	23	18	41
Summe	46	21	67

Diese Ergebnisse sind, unter Voranstellung der Blutkultur als Bezugsgröße, in Abbildung 18 dargestellt.

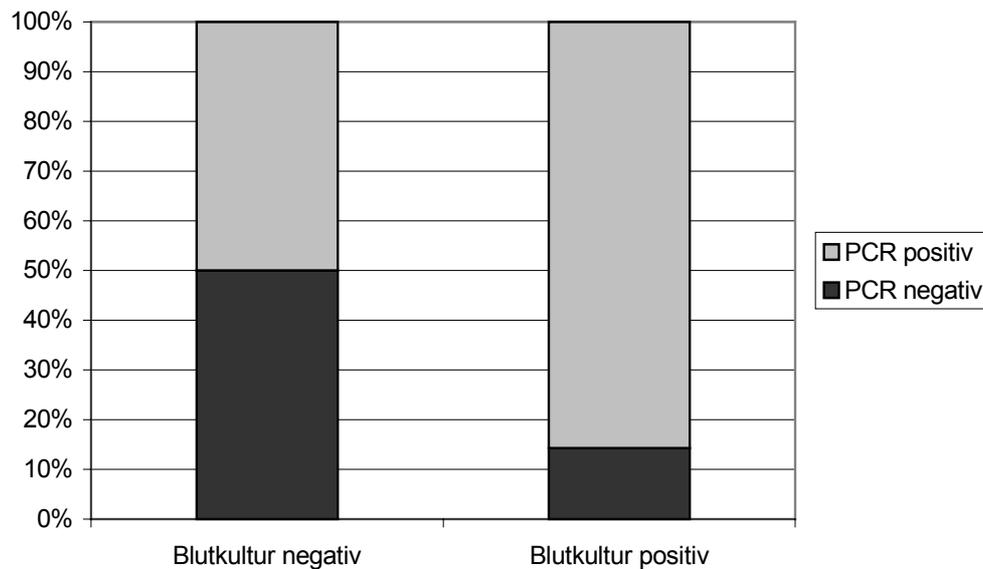


Abbildung 18: Ergebnisse des PCR- und blutkulturellen Bakteriennachweises aus Blutproben mit antibiotischem Einfluss

Die Betrachtung der prozentualen Gegenüberstellung der Ergebnisse des blutkulturellen und des PCR-Nachweises verdeutlicht eine nicht unerhebliche Verschiebung der Übereinstimmungsbilanz zu Gunsten der PCR durch den Einfluss einer antibiotischen Behandlung. 50% der blutkulturnegativen Proben wiesen in der PCR Bakterienbestandteile auf.

Die Ergebnisse des Bakteriennachweises mittels Polymerasekettenreaktion und Blutkultur zeigen einen signifikanten Zusammenhang ($p < 0,05$) und Unterschied ($p < 0,001$) bei den Blutproben mit vorheriger antibiotischer Behandlung.

Der Homogenitätstest nach Breslow and Day beweist jedoch, dass die Art des Zusammenhanges zwischen den beiden Vierfeldertafeln (Blutkultur versus

Polymerasekettenreaktion mit und ohne antibiotische Behandlung) sich nicht statistisch signifikant unterscheidet ($p > 0,05$). Daher erfolgt im Weiteren die Bewertung der Blutproben mit und ohne vorherigen antibiotischen Einfluss gemeinsam.

4.7.2 Vergleich der klinisch erworbenen mit den labordiagnostisch ermittelten Befunden unter Berücksichtigung der Probenanzahl

Zur Beurteilung der Schicksalhafterkeit eines Bakteriennachweises im Blut, sei es durch die Blutkultur oder durch die PCR, muss zuvor der Einfluss der Probenanzahl untersucht werden.

Um die Bedeutung der gefundenen Ergebnisse zu beschreiben, wird im Folgenden der Einfluss eines positiven oder negativen Ergebnisses der zu vergleichenden Untersuchungsverfahren der Diagnose und anschließend dem Schicksal der Kälber gegenübergestellt.

Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand der klinischen Diagnose. Da jedoch die Gruppen „Bronchopneumonie“, „Meningitis“ und „Polyarthritits“ nur mit jeweils drei respektive vier Tieren besetzt sind, erfolgte eine Zusammenlegung der Einzelgruppen für die statistische Auswertung in folgende drei Großgruppen:

1. Kälber mit einer klinischen Sepsis
2. schwer einzelorganerkrankte Tiere
3. Kontrolltiere

4.7.2.1 Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis der ersten Blutkultur

Im Zuge der klinischen Diagnosefindung wurden die Blutkulturergebnisse nicht berücksichtigt. Von den insgesamt 19 an einer klinischen Sepsis erkrankten Kälbern zeigten 9 Tiere (47,4%) ein Bakterienwachstum bereits in der ersten Blutkultur (Tabelle 50). In der Gruppe der schwer einzelorganerkrankten Neonaten gelang bei 11 der insgesamt 34 Kälber (32,4%) ein Bakteriennachweis. Darüber hinaus enthielt das Blut eines gesunden Kontrolltieres Bakterien (5%).

Tabelle 50: Klinische Diagnose der Kälber und Ergebnis der ersten blutkulturellen Untersuchung

Diagnose	Blutkultur negativ	Blutkultur positiv	Summe
Sepsis	10	9	19
Omphalitis	6	1	7
Diarrhoe	10	7	17
Bronchopneumonie	2	1	3
Meningitis	2	1	3
Polyarthritits	3	1	4
Kontrolltiere	19	1	20
Summe	52	21	73

Die statistische Auswertung mittels Chi²-Test bestätigte einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Diagnose und dem Ergebnis der ersten Blutkultur ($p < 0,05$). Bei Ausschluss der Kontrollgruppe zeigte sich, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Diagnose und dem Ergebnis der Blutkultur in den Gruppen „Sepsis“ und „schwer einzelorganerkrankte Tiere“ besteht ($p > 0,05$).

4.7.2.2 Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis von zwei Blutkulturen

Ein blutkultureller Nachweis ist im Folgenden dann positiv, wenn in einer der beiden Proben Bakterien aufgefunden wurden.

Betrachtet man die Ergebnisse nach Berücksichtigung beider Blutkulturen, so ergeben sich folgende Werte (Tabelle 51).

Tabelle 51: Klinische Diagnose der Kälber und Ergebnisse von zwei blutkulturellen Untersuchungen

Diagnose	Blutkultur negativ	Blutkultur positiv	Summe
Sepsis	5	8	13
Omphalitis	2	2	4
Diarrhoe	4	5	11
Bronchopneumonie	0	2	2
Meningitis	2	1	3
Polyarthritits	2	0	2
Kontrolltiere	17	1	18
Summe	32	21	53

Bereits bei 61,5% der Kälber mit einer klinischen Sepsis konnten Bakterien in der Blutkultur nachgewiesen werden. In der Gruppe der einzelorganerkrankten Tiere lag der Anteil jetzt bei 54,5% (12 von 22 Tieren).

Auch hier besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Ergebnis der Blutkultur und der Diagnose ($p < 0,05$). Zum Ausschluss des Einflusses der Kontrollgruppe auf das Gesamtergebnis erfolgte eine weitere statistische Prüfung. Es zeigte sich, dass es keinen signifikanten Zusammenhang

zwischen der Diagnose und dem Ergebnis der Blutkultur in den Gruppen „Sepsis“ und „schwer einzelorganerkrankte Tiere“ gibt ($p > 0,5$).

Es bleibt festzuhalten, dass ein höherer Anteil klinisch als septisch eingestufte Kälber zwar einen positiven Blutkulturnachweis aufwies, der Anteil der positiven Ergebnisse jedoch in der Gruppe „schwer einzelorganerkrankter Tiere“ in gleichem Maße zunahm.

4.7.2.3 Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis eines PCR-Nachweises

Bezüglich des Zusammenhangs zwischen der Diagnose und dem Ergebnis des PCR-Nachweises fand ebenfalls die statistische Auswertung in den Gruppen „Sepsis“, „schwer einzelorganerkrankte Tiere“ und „Kontrolltiere“ statt.

Bereits nach alleiniger Berücksichtigung einer Blutuntersuchung befanden sich bei 14 der 19 septisch erkrankten Tieren Spuren bakterieller DNA in der Blutprobe (Tabelle 52). Dies entspricht einem prozentualen Anteil von 73,7%. Die Proben der schwer einzelorganerkrankter Kälber enthielten zu 58,8% (20 von 34) Bakterien. Bei drei der insgesamt 20 Kontrolltiere (15%) fand ebenfalls ein positiver Nachweis statt.

Tabelle 52: Klinische Diagnose der Kälber und Ergebnis der ersten PCR-Untersuchung

Diagnose	PCR negativ	PCR positiv	Summe
Sepsis	5	14	19
Omphalitis	3	4	7
Diarrhoe	6	11	17
Bronchopneumonie	1	2	3
Meningitis	2	1	3
Polyarthritits	2	2	4
Kontrolltiere	17	3	20
Summe	36	37	73

Zwischen dem Ergebnis der PCR und der Diagnose besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,001$). Zum Ausschluss des Einflusses der Kontrollgruppe auf das Gesamtergebnis erfolgte eine weitere statistische Prüfung. Es zeigte sich, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Diagnose und dem Ergebnis der PCR in den Gruppen „Sepsis“ und „schwer einzelorganerkrankte Tiere“ besteht ($p > 0,05$).

4.7.2.4 Vergleich der klinischen Diagnose mit dem Ergebnis von zwei PCR-Nachweisen

Bei der folgenden Aufstellung wurde ein positiver Nachweis in der ersten und/oder zweiten Probe als positives Ergebnis gewertet (Tabelle 53).

Tabelle 53: Klinische Diagnose der Kälber und Ergebnis von zwei PCR-Untersuchungen

Diagnose	PCR negativ	PCR positiv	Summe
Sepsis	0	13	13
Omphalitis	1	3	4
Diarrhoe	2	9	11
Bronchopneumonie	0	2	2
Meningitis	1	2	3
Polyarthritits	1	1	2
Kontrolltiere	16	2	18
Summe	21	32	53

Nach einer zweifachen Blutuntersuchung mittels PCR konnten bei 100% der septisch erkrankten Tiere Bakterien aufgespürt werden. In der Gruppe der schwer einzelorganerkrankten Tiere zeigten insgesamt 17 der 22 Kälber (77,3%) einen positiven Bakteriennachweis.

Zwischen dem Ergebnis der ersten und zweiten PCR und der Diagnose besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p < 0,0001$). Die weitere Berechnung ohne Berücksichtigung der Kontrollgruppe zeigte auch hier, dass kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Diagnose und dem Ergebnis der ersten und zweiten PCR-Probe in den Gruppen „Sepsis“ und „schwer einzelorganerkrankte Tiere“ besteht ($p > 0,05$).

4.7.3 Vergleich des Schicksals der Kälber mit den labordiagnostisch ermittelten Befunden unter Berücksichtigung der Probenanzahl

Im Folgenden wird das Ergebnis der ersten Blutprobe, anschließend das Ergebnis der ersten und der zweiten Blutprobe dem Schicksal der Kälber gegenübergestellt.

4.7.3.1 Retrospektive Auswertung der blutkulturellen Untersuchung unter alleiniger Berücksichtigung der ersten Blutprobe

Durch eine alleinige Berücksichtigung der ersten der zwei untersuchten Blutkulturen wurden bei 50% der verstorbenen und 50% der euthanasierten Kälber Bakterien in der Blutbahn nachgewiesen. 14,3% der chronisch erkrankten, 28,6% der geheilten und 5% der gesunden Kontrolltiere zeigten ein bakterielles Wachstum in der ersten Blutkultur.

Tabelle 54: Schicksal der Kälber und Ergebnis der blutkulturellen Untersuchung unter alleiniger Berücksichtigung der ersten Blutprobe

Schicksal	Blutkultur negativ	Blutkultur positiv	Summe
gestorben	9	9	18
euthanasiert	4	4	8
chronisch krank	6	1	7
geheilt	14	6	20
Kontrolltiere	19	1	20
Summe	52	21	73

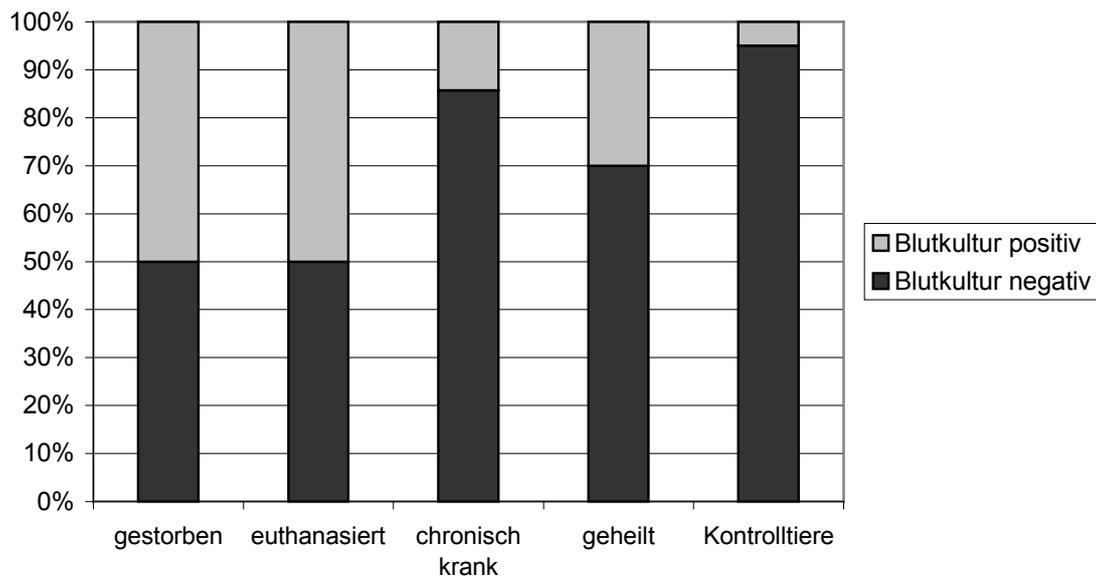


Abbildung 19: Schicksal der Kälber und Ergebnis der blutkulturellen Untersuchung unter alleiniger Berücksichtigung der ersten Blutprobe

Zur statistischen Auswertung erfolgte eine Zusammenfassung der Gruppen „gestorben“, „euthanasiert“ und „chronisch krank“ in die Schicksalsgemeinschaft „nicht geheilt“.

Zwischen dem Schicksal der Kälber und dem Ergebnis der ersten Blutkultur besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang (Chi²-Test: $p < 0,05$).

4.7.3.2 Retrospektive Auswertung der blutkulturellen Untersuchung unter Berücksichtigung der ersten und zweiten Blutprobe

Werden beide Ergebnisse der Blutkultur in die Auswertung mit einbezogen, so ergeben sich die in Tabelle 55 dargestellten Werte.

Tabelle 55: Schicksal der Kälber und Ergebnis der blutkulturellen Untersuchung unter Berücksichtigung der ersten und zweiten Blutprobe

Schicksal	Blutkultur negativ	Blutkultur positiv	Summe
gestorben	2	8	10
euthanasiert	3	3	6
chronisch krank	3	3	6
geheilt	7	6	13
Kontrolltiere	17	1	18
Summe	32	21	53

Festzustellen ist, dass 50% der euthanasierten und chronisch kranken Kälber ein blutkulturpositives Ergebnis aufwiesen. Die verstorbenen Tiere jedoch hatten in 80% der Fälle Bakterien in der Blutbahn. Von der Gruppe der geheilten Tiere zeigten nur 46,2% ein Bakterienwachstum in der Blutkultur. Die Anzahl der Bakteriennachweise in der Gruppe der Kontrolltiere zeigte keine Änderung (Abbildung 20).

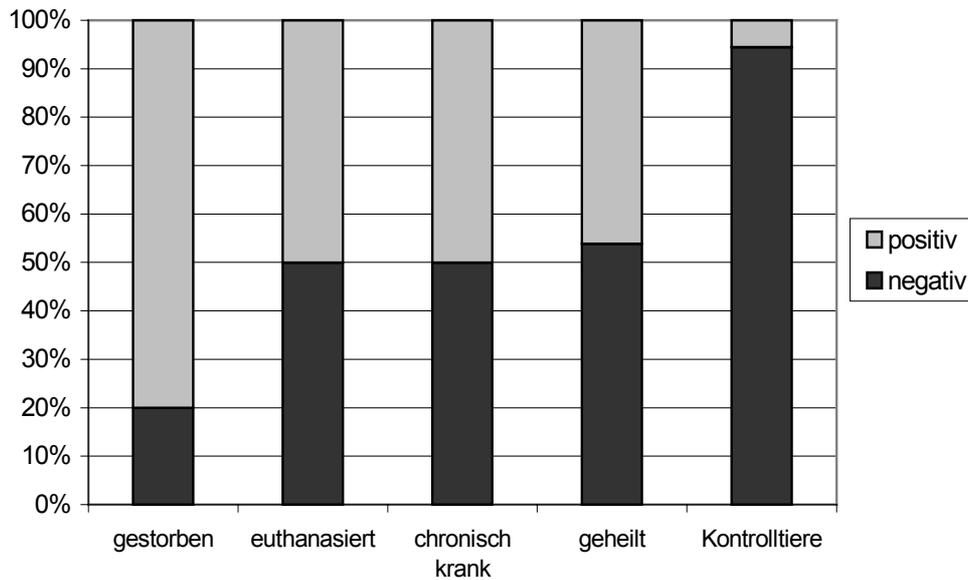


Abbildung 20: Schicksal der Kälber und Ergebnis der ersten und zweiten blutkulturellen Untersuchung

Auch hier fand die statistische Auswertung für die Gruppen „geheilt“, „nicht geheilt“ und „Kontrolltiere“ statt. Zwischen dem Schicksal der Kälber und dem Ergebnis der ersten und zweiten Blutkultur besteht ein statistisch signifikanter Zusammenhang (Chi² - Test: $p < 0,05$).

Zum Ausschluss des Einflusses der Kontrollgruppe auf das Gesamtergebnis, wurde diese in einer weiteren Berechnung nicht mit einbezogen. Es zeigte sich, dass nunmehr keine statistisch signifikanten Zusammenhänge zwischen den Ergebnissen der Blutkultur und dem Schicksal der Tiere bestanden ($p > 0,05$).

4.7.3.3 Retrospektive Auswertung des PCR-Nachweises unter alleiniger Berücksichtigung der ersten Blutprobe

Werden dagegen die Ergebnisse des ersten PCR-Nachweises betrachtet, so ist auffällig, dass die gestorbenen und euthanasierten Kälber in 72,2%, respektive 75% der Proben bereits nach einer Untersuchung ein positives Ergebnis aufwiesen. Die geheilten Tiere hingegen wurden in 52,4% der Proben positiv getestet. Von den gesunden Kontrolltieren zeigten 3 (15%) bakterielle Bestandteile in der Blutbahn (Tabelle 56, Abbildung 21).

Tabelle 56: Schicksal der Kälber und Ergebnis der ersten PCR-Probe

Schicksal	PCR negativ	PCR positiv	Summe
gestorben	5	13	18
euthanasiert	2	6	8
chronisch krank	2	4	6
geheilt	10	11	21
Kontrolltiere	17	3	20
Summe	36	37	73

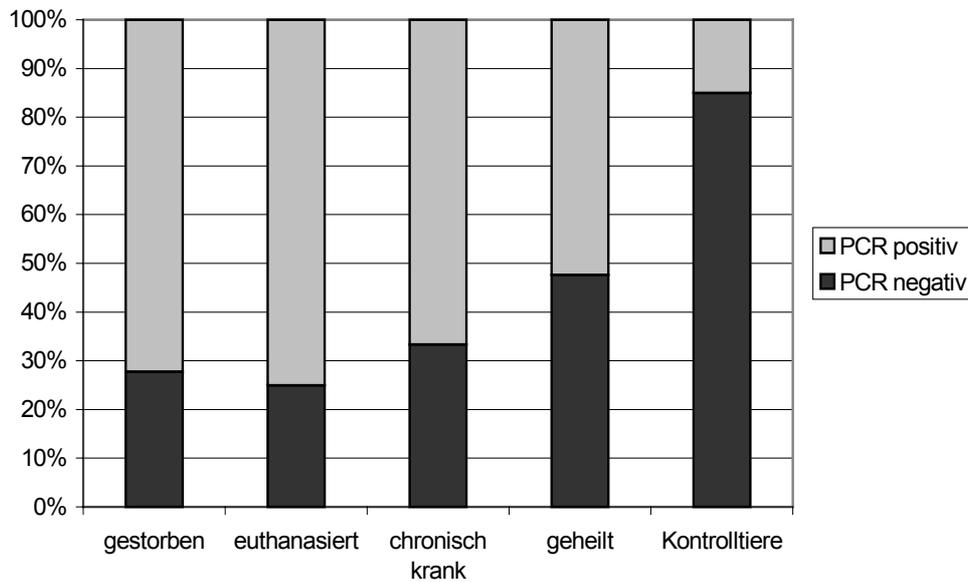


Abbildung 21: Schicksal der Kälber und Ergebnis des PCR-Nachweises der ersten Blutprobe

Die statistische Überprüfung zwischen dem Ergebnis des ersten PCR-Nachweises und dem Schicksal der Kälber erbrachte eine statistisch gesicherte Beziehung ($p < 0,001$).

4.7.3.4 Retrospektive Auswertung des PCR-Nachweises unter Berücksichtigung der ersten und zweiten Blutprobe

Werden beide Ergebnisse des PCR-Nachweises berücksichtigt, so zeigt sich eine deutliche Erhöhung der Positivbefunde.

Bei 100% der später verstorbenen Tieren war bakterielle DNA mittels PCR nachzuweisen. 83,3% der euthanasierten und 66,7% der chronisch erkrankten

Tiere zeigten nun ebenfalls ein positives PCR-Ergebnis (Tabelle 57, Abbildung 22).

Tabelle 57: Schicksal in Abhängigkeit zum Ergebnis der ersten und zweiten PCR-Probe

Schicksal	PCR negativ	PCR positiv	Summe
gestorben	0	10	10
euthanasiert	1	5	6
chronisch krank	2	4	6
geheilt	2	11	13
Kontrolltiere	16	2	18
Summe	21	32	53

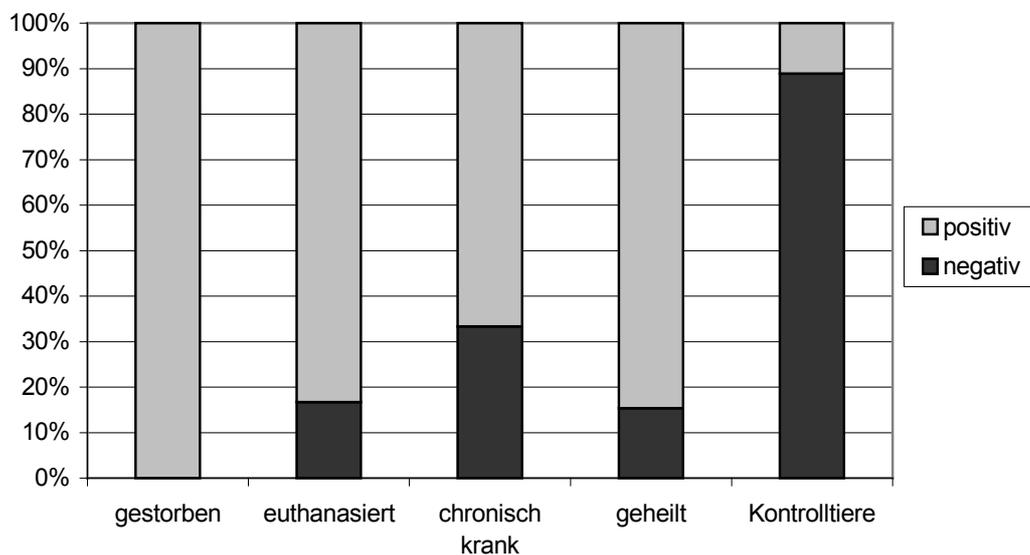


Abbildung 22: Schicksal der Kälber in Abhängigkeit zum Ergebnis der ersten und zweiten PCR-Probe

Auch unter Berücksichtigung der Ergebnisse der ersten und zweiten Blutprobe ergibt die statistische Überprüfung einen signifikanten Zusammenhang zum Verbleib der Kälber ($p < 0,001$). Zum Ausschluss des Einflusses der Kontrollgruppe auf das Gesamtergebnis, wurde diese in einer weiteren Berechnung nicht mit einbezogen. Es erwies sich, dass nunmehr kein statistisch signifikanter Zusammenhang mehr zwischen den Ereignissen bestand ($p > 0,05$).

In der folgenden Tabelle 58 ist abschließend der Einfluss der Probenanzahl auf das Untersuchungsergebnis der Blutkultur und der PCR dargestellt.

Tabelle 58: Anzahl der positiv getesteten Kälber in % in Abhängigkeit zur Anzahl der berücksichtigten Proben

Diagnose	1 Probe		2 Proben	
	Blutkultur	PCR	Blutkultur	PCR
Sepsis	47,4	73,7	61,5	100
einzelorganerkrankte Tiere	32,4	58,8	54,5	77,3
Kontrolltiere	5	15	5,5	12,5

5 DISKUSSION

Um die Grundlage für eine frühzeitige Sepsisdiagnose schaffen zu können, musste eine Methode gefunden werden, die es gestattet, Bakterien im Blut innerhalb kurzer Zeit mit einer hohen Sensitivität aufzuspüren.

Aus zahlreichen Studien geht hervor, dass die auch in dieser Arbeit gewählten 16S-rRNA-Universalprimer dazu in der Lage sind, nahezu alle pathogenen und nicht pathogenen Keime zu detektieren (KANE et al., 1998; CURSONS et al., 1999; RENO et al., 2001; SLEIGHT et al., 2000 und 2001).

Um herauszufinden, mit welcher Sensitivität einige der ursächlichen Sepsiserreger des Kalbes durch die verwendeten Oligonukleotidprimer nachzuweisen sind, wurden zunächst Vorversuche durchgeführt (Kapitel 3.2.6.1). Dabei zeigte sich, dass Nachweisschwächen im Bereich der grampositiven Bakterien und im Falle von *Klebsiella pneumoniae* vorlagen. Zur genaueren Differenzierung der Ursache war es deshalb erforderlich herauszufinden, ob diese Verfehlungen auf eine unzureichende DNA-Menge im Ausgangsmaterial oder auf den Amplifikationsvorgang zurück zu führen sind. Es ergab sich, dass bereits während der DNA-Isolierung unter standardisierten Bedingungen die DNA-Ausbeute im Bereich der grampositiven Bakterien erheblich geringer war als bei den gramnegativen Erregern. Diese Ergebnisse lassen sich mit dem unterschiedlichen Aufbau grampositiver und gramnegativer Bakterienzellwände erklären. Die Zellwanddicke grampositiver Bakterien beträgt 15-80 nm, während jene gramnegativer Erreger nur eine solche von 10-15 nm aufweisen. Dieser Unterschied basiert auf der umfangreichen Mureinschicht (Peptidoglycan) der grampositiven Erreger, die es vermag, den Zellkern vor einwirkenden Noxen, so auch den verwendeten Lysislösungen, wirkungsvoll zu schützen. *Staphylococcus aureus* verfügt zusätzlich über eine Schleimkapsel, welche mit dazu beiträgt, dass eine Vermehrung selbst bei Kochsalzgehalten von 10% möglich ist (SELBITZ, 2002). Diese Erfahrung machte auch CURSONS mit seiner Arbeitsgruppe 1999. Er verbesserte die Extraktionsmethode, indem er aus Hühnereiweiß gewonnenes

Lysozym zusetzte. Diese Methode erwies sich als wirkungsvoll. Eine weitere Lösung dieses Problems bietet die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Verlängerung der Inkubationszeit der Lysozymlösungen, um eine adäquate DNA-Ausbeute sicherstellen zu können. Eine Verlängerung der Einwirkzeit von 30 Minuten auf 20 Stunden führte zu einer 3,78 fachen Konzentrationssteigerung der DNA von *Staphylococcus aureus* und einer 7,75 fachen Erhöhung von *Arcanobacterium pyogenes*-DNA in der Probe. Die getesteten gramnegativen Keime (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) zeigten keine nennenswerten Konzentrationsänderungen in Folge der verlängerten Lysiszeiten. Im Zuge der Sensitivitätsbestimmung blieb der Nachweis von *Staphylococcus aureus* weiterhin problematisch, so dass eine Nachweisgrenze von 100 KBE festgehalten werden musste.

In der zugrunde liegenden Arbeit von CURSONS et al. (1999) fand lediglich eine Sensitivitätsbestimmung am Beispiel von *E. coli* statt. In seiner Untersuchung waren dazu 1-5 KBE erforderlich. Eine Nachweisschwäche im grampositiven Keimspektrum wurde auch von ihm festgestellt, jedoch nicht weiterführend untersucht. In der hier vorliegenden Arbeit waren 100 KBE erforderlich, um einen positiven Nachweis von *Staphylococcus aureus* zu erlangen. Im Vergleich zur Blutkultur stellt dies ein schlechtes Resultat dar. Im Laufe der klinischen Gegenüberstellung der beiden Untersuchungsmethoden trat kein Fall einer *Staphylococcus aureus* Infektion auf. *Staphylococcus intermedius* jedoch wurde tatsächlich vom Blutkultursystem zweimal erfasst, während mittels PCR nur in einem Fall ein Keimnachweis gelang.

Als weiterer Problemkeim erwies sich *Klebsiella pneumoniae*. Sowohl in den Vorversuchen als auch bei der Untersuchung von Blutproben entsprechend erkrankter Kälber zeigte sich die Blutkultur der PCR überlegen. So waren als Sensitivitätsgrenze in der Blutkultur 1 KBE, in der PCR jedoch 10 KBE zu ermitteln. Bei einem der insgesamt zwei blutkulturellen *Klebsiella pneumoniae*-Nachweisen gelang keine Bestätigung durch die PCR. Die umfangreiche Schleimkapsel dieses Keimes kann eine mögliche Ursache dieser

Nachweisschwäche darstellen. Weitere im Zuge der PCR nicht oder nicht in gleichem Maße erfasste Keime sind *Neisseria* und *Corynebacterium Species* sowie aerobe Bazillen.

Kritisch sei an dieser Stelle das Arbeiten mit verschiedenen Verdünnungsstufen im Zuge der Sensitivitätsbestimmung des Blutkultursystems und der PCR betrachtet. Dieses Vorgehen birgt diskussionswürdige Unsicherheiten, da der so genannte „Verdünnungseffekt“ nicht berücksichtigt werden kann. Da aus technischen Gründen eine andere Form des spikens der Blutkulturflaschen mit definierten Erregermengen nicht durchführbar war, musste diese Ungenauigkeit in Kauf genommen werden.

Vorrangiges Ziel dieser Arbeit war es, den Nachweis bakterieller DNA mittels eines Universalprimers aus Blutproben schwerwiegend erkrankter neonataler Kälber als Untersuchungsmethode zu etablieren. Als Bezugsmethode diente die bisher als „gold standard“ angesehene Blutkultur. Zwar liefert die Blutkultur viele wichtige Ergebnisse, so zum Beispiel einen exakten Erregernachweis mit dazugehörigem Resistenztest, jedoch ist der zeitliche Abstand zwischen Probenentnahme und Vorliegen eines verwertbaren Ergebnisses so groß, dass eine sichere und zielgerichtete Versorgung eines erkrankten Kalbes erst nach einer erheblichen zeitlichen Verzögerung durchgeführt werden kann.

Die in der vorliegenden Arbeit in Anlehnung an CURSONS et al. (1999) verwendete und für die Untersuchung von Kälberblutproben modifizierte Untersuchungsmethode zur Bestimmung bakterieller DNA aus dem Blut septisch oder schwer einzelorganerkrankter Kälber mittels Polymerasekettenreaktion stellt ein Verfahren dar, welches innerhalb von 7-14 Stunden sichere und reproduzierbare Ergebnisse zur Keimbelastung der untersuchten Blutprobe liefern kann. Damit reduziert sich die benötigte Zeitspanne gegenüber der Blutkultur um bis zu drei Tage. Die Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Methoden verdeutlicht die statistisch abgesicherte Überlegenheit der PCR. Fast die Hälfte der bakterienenthaltenden Blutproben (28 von 61) wäre durch eine alleinige Untersuchung mittels Blutkultur unentdeckt geblieben.

Da die Aussaat von Bakterien aus dem primären Infektionsherd in die Blutbahn nicht als lineares, sondern vielmehr als wellenförmiges Ereignis anzusehen ist, muss eine mehrmalige blutkulturelle Untersuchung zur Absicherung der Diagnose durchgeführt werden (ARONSON et al., 1987; KURLAT et al., 1989, WICKELHAUS et al., 1999). Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass bei 73,7% der klinisch als septisch eingestuften Kälber bereits nach *einer* Blutuntersuchung mittels PCR Bakterienbestandteile entdeckt werden konnten, während dies bei der Blutkultur nur 47,4% waren. Nach Berücksichtigung von zwei Blutuntersuchungen zeigten 100% der septisch eingestuften Kälber positive PCR-Ergebnisse, mittels Blutkultur jedoch nur 61,5%. In der Gruppe der schwer einzelorganerkrankten Kälber war ebenfalls zu beobachten, dass ein größerer Anteil von Tieren (58,8%) bereits nach einer PCR-Untersuchung positive Resultate vorwies als nach zwei Untersuchungen mittels Blutkultur (54,5%). Das bedeutet eine statistisch signifikante Steigerung des prädiktiven Wertes schon nach einer Blutuntersuchung ($p < 0,001$).

Bei Betrachtung der Gesamtergebnisse des Methodenvergleiches (Kapitel 4.7) stellt sich zwangsläufig die Frage, ob die zahlreichen positiven PCR-Proben wahr oder falsch positive Ergebnisse darstellen. Unbestritten ist die hohe Empfindlichkeit dieser Untersuchungsmethode. Die kleinste Verunreinigung im Zuge der Probenentnahme und Aufbereitung kann durch die millionenfache Vervielfältigung der Bakterienfragmente während der Amplifizierung zu falsch positiven Ergebnissen führen. Im Zuge der Gegenüberstellung der beiden Methoden mussten zwei Blutproben entnommen werden, da die Blutkultur mit nicht gerinnungsgehemmtem Blut durchgeführt wird, die Aufbereitung für die PCR jedoch eine Gerinnungshemmung erfordert. Dadurch ist nicht auszuschließen, dass eine der Proben im Laufe der Entnahme oder der weiteren Verarbeitung kontaminiert werden kann. Daraus folgt, dass ein durch die PCR nicht bestätigter Erregernachweis in der Blutkultur nicht zwingend auf ein Versagen der PCR zurückzuführen ist. Im umgekehrten Fall muss aber auch die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass während der DNA-Aufreinigung und -Extraktion

eine Kontamination stattfindet, die der Blutkultur fälschlich eine Nachweislücke anlastet.

Die Überprüfung des Blutkultursystems bezüglich der erforderlichen Keimmenge für einen erfolgreichen Bakteriennachweis zeigte keine Abweichungen von den Herstellerangaben. Bei den fünf im Zuge der Vorversuche untersuchten Keimen waren 1-10 KBE für einen positiven Nachweis erforderlich.

Der selbstkritischen Überprüfung der Blutprobenentnahmetechnik und der Probenaufbereitung für die PCR ist daher eine besondere Gewichtung beizumessen. Dies sind die wichtigsten Gründe für das stetige Mitführen von Negativkontrollen bei jeder Amplifizierung. Da jedoch keine objektive Messmethode („gold standard“) existiert, liegt es, bei Einhaltung aller Maßnahmen zur Kontaminationsverhinderung, im Auge des Betrachters, unter Berücksichtigung aller Umstände und auf Grundlage der klinischen Erfahrung die Untersuchungsergebnisse zu beurteilen. Betrachtet man das Schicksal der Schnittmenge blutkulturnegativer und PCR-positiver Kälber so wird deutlich, dass fünf der gestorbenen, fünf der geheilten sowie eines der Kontrolltiere diesen Anteil bestreiten. Der deutlich höhere Anteil positiver Ergebnisse in der Kontrollgruppe bei der Untersuchung mittels PCR kann in zwei Richtungen ausgelegt werden. Zum Einen können auch bei gesunden Individuen bakteriämische Episoden auftreten, zum Anderen muss in Betracht gezogen werden, dass trotz Einhaltung aller kontaminationsverhütenden Maßnahmen eine insgesamt höhere Kontaminationsrate vorliegt.

Die Ergebnisse der blutkulturellen Untersuchungen zeigten, dass es sich bei 70,4% der positiven Einzelnachweise um gramnegative Erreger und bei 29,6% um grampositive Bakterien handelte. In gleichfalls 29,6% der Proben konnte *E. coli* in Reinkultur isoliert werden. Zweithäufigst nachgewiesene Keime waren *Pseudomonas Species* (18,5%) gefolgt von *Klebsiella pneumoniae*, Staphylokokken, Streptokokken, *Corynebacterium* und *Neisseria Species* in gleichen Teilen (jeweils 7,4%). Die Frage, inwiefern es sich bei den gefundenen Keimen um Kontaminanden oder Infektionen handelt, ist nicht eindeutig zu

beantworten. Hilfreich ist die Betrachtung der Einzelschicksale der Kälber mit einem Keimwachstum in der Blutkultur. Zweifelsfrei wahr positiv zu werten sind die Fälle blutkulturell positiver *E. coli* sowie *Pseudomonas Species*-Nachweise. Von den acht *E. coli*-positiven Proben konnte keines der zugehörigen Kälber geheilt werden, sechs verstarben sogar noch am Tag der Probenentnahme. In fünf Fällen lautete die klinische Diagnose Sepsis, zwei wurden als hochgradig diarrhoeerkrankt klassifiziert und ein weiteres Tier zeigte eine schwerwiegende Bronchopneumonie. Drei der fünf Tiere mit erfolgtem Nachweis von Pseudomonaden verstarben alsbald. Zwei an einer Diarrhoe erkrankte Tiere konnten geheilt entlassen werden.

Als falsch positiv sind lediglich die Keimnachweise bei den Kontrolltieren zu bewerten. Die nachgewiesenen Streptokokken, *Corynebacterium* und *Neisseria Species* bei den erkrankten Tieren hingegen sind ambivalent zu beurteilen. Eine differenziertere Betrachtung sogenannter Umweltkeime als Kontaminanden muss nach WEINSTEIN et al. (1983) und WICKELHAUS et al. (1999) erfolgen. In ihren Untersuchungen zeigten sie, dass 21% der *Corynebacterium Species* und 6% der *Staphylococcus epidermidis*-Nachweise wahr positive Ergebnisse darstellten. In der Buiatrik besitzen lediglich *Corynebacterium cystitidis* und *Corynebacterium renale* pathogene Eigenschaften. Als Erreger von Harnwegsinfekten werden sie in großen Mengen ausgeschieden und sind in der Lage, mehrere Wochen in ihrer Umwelt zu überleben (SELBITZ, 2002). Darüber hinaus existiert eine Vielzahl nicht näher differenzierter, weitestgehend apathogener *Corynebacterium Species*, welche jedoch ebenfalls als Folge einer nosokomialen Infektion immunsupprimierter Kälber zu einer Sepsis führen können. In gleicher Weise ist der erfolgte Nachweis α -hämolisierender Streptokokken (*Streptococcus uberis* und *Streptococcus dysgalactie*) zu beurteilen. Die nachgewiesenen *Acinetobacter Species* finden im veterinärmedizinischen Bereich bislang wenig Beachtung. Besonders in der Intensivbetreuung von SIRS-Patienten sowie pädiatrischen Intensiveinheiten ist der Speziesvertreter *Acinetobacter baumannii* neuerlich ein gefürchteter Verursacher beatmungsassoziierter Pneumonien sowie nosokomialer Septikämien, die nicht selten ein tödliches Ende finden (GOEL et al., 2001;

HUANG et al. 2002; GORMAN et al., 2003; THEAKER et al., 2003). THEAKER und Koautoren veröffentlichten 2003 die Ergebnisse ihrer Untersuchungen zur Verbreitung von *Acinetobacter baumannii* in zwei Intensivstationen. Sie konnten nachweisen, dass 41% der Patienten einer Intensivstation mit einer sekundären *Acinetobacter baumannii*-Infektion starben, während diejenigen ohne eine zusätzliche Kolonisation oder Infektion mit *Acinetobacter baumannii* eine signifikant niedrigere Sterblichkeitsrate (21%) aufwiesen.

Die in dieser Arbeit erfolgten *Acinetobacter*-Nachweise lagen ausnahmslos als Mischkultur mit unspezifischen Keimen vor. Von den drei betroffenen Kälbern überlebte nur eines durch intensivtherapeutischen Aufwand (30 Tage). Auch die Vertreter der Gattung *Neisseria* sind fast ausschließlich humanpathogen (LEWIN et al., 1966; SELBITZ, 2002; STEPHENS et al., 2002). Die drei dokumentierten Fälle eines positiven Blutkulturnachweises im Zuge dieser Arbeit zeigen ein inhomogenes Krankheitsbild. Einzelnachweise erfolgten bei zwei Tieren. Das eine Kalb litt an einer hoch fieberhaften Nabelentzündung (41,2°C), konnte aber nach sieben Tagen Klinikaufenthalt geheilt entlassen werden. Das zweite Tier wies eine Meningitis auf und wurde nach 11 Tagen aufgrund eines ausbleibenden Therapieerfolges bei Verschlechterung des Allgemeinzustandes euthanasiert. Der dritte Nachweis erfolgte in Mischkultur mit *Staphylococcus epidermidis* bei einem an einer schwerwiegenden Diarrhoe erkrankten Tier, welches noch am gleichen Tag verstarb. Aufgrund dieser Ergebnisse ist festzuhalten, dass sowohl der Nachweis von Mischkulturen, als auch jener von Reinkultur, die in keinem kausalen Zusammenhang mit der Erkrankung stehen, die Prognose ad vitam für das betreffende Tier erheblich verschlechtern.

Der in der PCR unbestätigte Nachweis aerober Bazillen betraf ein 7 Tage altes, an einer hochgradigen Diarrhoe erkranktes Tier, welches nach 8 Tagen entlassen werden konnte. In diesem Fall ist sowohl eine Kontamination des Blutes im Sinne einer Nosokomialinfektion, als auch eine Kontamination im Zuge der Probenweiterverarbeitung und Überführung in das Blutkulturmedium denkbar.

Die Kontaminationsrate der Blutkultur wird von anderen Forschergruppen (WEINSTEIN et al., 1983; FECTEAU et al., 1997; WILSON et al. 2000; FECTEAU et al., 2001) mit 1,3-5,5% beziffert. Die im Zuge dieser Arbeit ermittelten 3% bewegen sich somit im mittleren Wertebereich. Der Anteil falsch positiver Proben bei der Blutuntersuchung mittels PCR in Höhe von 4,9% ist im Vergleich zu den Ergebnissen aus der Blutkultur deutlich höher.

Eine getrennte Untersuchung von Plasma und Leukozyten wurde im Zuge dieser Arbeit angestrebt, um den Status quo der Keimaussaat aus dem primären Infektionsherd genauer verfolgen zu können. Es zeigte sich allerdings, dass Lagerungseinflüsse, auch bei sofortiger Weiterverarbeitung des Probenmaterials nicht ausgeschlossen werden können. Verzögerungszeiten von wenigen Minuten können bereits eine Inokulation von frei im Blutplasma vorliegenden Keimen durch die enthaltenen Leukozyten zur Folge haben und somit die Untersuchungsergebnisse erheblich beeinträchtigen (JAIN, 2001). Da nur vier Blutproben mikrobielle DNA im Plasma, nicht aber in den Leukozyten enthielten, liegt die Vermutung nahe, dass auch hier eine Inokulation der Bakterien durch zur Phagozytose befähigte Zellen stattgefunden hat. Ob dieser Vorgang intra- oder extrakorporal stattgefunden hat, kann auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht abschliessend beantwortet werden. Begleitend zu einem Bakteriennachweis in den Leukozyten hingegen waren in 25 von 57 Proben auch Bakterien im Plasma auffindbar. Da keine statistisch signifikanten Aussagen bezüglich der Prädiktivität eines Bakteriennachweises im Blutplasma getroffen werden können, liegt die Entscheidung nahe, im Zuge einer Anwendung dieser Untersuchungsmethode in der Diagnostik auf die getrennte Bearbeitung des Plasmas und der Leukozyten zu verzichten. Dadurch verkürzt sich der zeitliche Aufwand, je nach Probenanzahl, um weitere 30 bis 60 Minuten, da eine erhebliche Anzahl von Aufreinigungs- und Extraktionsschritten entfällt.

Der Einfluss einer bereits vor der Probenentnahme erfolgten antibiotischen Therapie erwies sich, basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit, unbedeutender als von einigen Autoren (ARONSON et al., 1987; FECTEAU et

al.,1997) angenommen. Eine Begründung dafür ist die stetige Verbesserung der Zusammensetzung der einzelnen Blutkulturmedien. Um die bakterizide Aktivität des Serums sowie antimikrobieller Substanzen im Blut zu neutralisieren, enthalten moderne Blutkulturmedien, neben der Nährbouillon und zahlreichen anderen Zusätzen, polyanionische Antikoagulanzen (Natrium-polyabethylsulfonat). Diese unterbinden die Komplementreaktion, hemmen die Lysozym-Aktivität und inhibieren die Phagozytose. Auch antibiotische Wirkstoffe der Aminoglykosid- und Polymyxingruppe werden dadurch inaktiviert. In 25% der blutkulturnegativen Proben ohne antibiotischen Einfluss war bakterielle DNA mittels PCR nachweisbar. Bei Betrachtung der antibiotisch beeinflussten Proben betrug dieser Anteil 50%. Zahlenmäßige Unterschiede sind also durchaus vorhanden, doch zeigt die statistische Überprüfung, dass ein signifikanter Unterschied zwischen den Untersuchungsergebnissen von Blutproben mit und ohne antibiotischen Einfluss nicht darstellbar ist (Kapitel 4.7.1).

Unter Berücksichtigung des Schicksales der Kälber der verschiedenen Diagnosegruppen wurde deutlich, dass auch unter besten Behandlungsbedingungen die Letalität septisch erkrankter Tiere bei 84% liegt. Ähnlich hohe Werte werden auch von anderen Autorengruppen angegeben. ROBERTS und Koautoren beziffern 1986 die Mortalitätsrate septisch erkrankter, kolostral unterversorgter Kälber mit bis zu 94% in den ersten zwei Lebenswochen. Die Gruppe um ALDRIDGE (1993) verzeichnete eine Überlebensrate von 12%. Die erhobenen Daten entstammen alle Untersuchungen aus veterinärmedizinischen Kliniken. Es handelt sich also um keine repräsentativen Werte, da davon auszugehen ist, dass nur hochgradig erkrankte Tiere, die keinerlei Ansprache auf haustierärztliche Vorbehandlungen gezeigt haben, in eine Klinik eingeliefert werden. Der hohe Anteil tödlich verlaufender Diarrhoeerkrankungen ist darauf zurückzuführen, dass nur jene Tiere in die vorliegende Untersuchung aufgenommen wurden, die bereits eine starke Beeinträchtigung des Allgemeinbefindens aufwiesen. Der Übergang zwischen einer schweren Einzelorganerkrankung, beispielsweise einer Diarrhoe, und einer septischen Erkrankung ist fließend und klinisch nicht zu erfassen. So können

beispielsweise diarrhoeerkrankte Kälber zum Einen aufgrund einer ausgeprägten Exsikkose und Untertemperatur, zum Anderen jedoch auch als Folge eines septischen Geschehens ein somnolentes Verhalten zeigen. Der bemerkenswerteste Unterschied dabei ist, dass nicht septisch erkrankte Tiere nach erfolgtem Flüssigkeits- und Elektrolytausgleich sowie einer Anhebung der Körpertemperatur bereits nach kurzer Zeit eine deutliche Besserung des Allgemeinbefindens zeigen, während septisch erkrankte Tiere auch bei wiederhergestellter Homöostase keine oder nur eine geringfügige klinische Besserung aufweisen.

Die häufig als pathognostisches Merkmal herangezogene Rot- oder Graufärbung der Schleimhäute kann auf Grundlage dieser Untersuchung als Indiz, nicht jedoch als sicheres Merkmal zur Sepsisdiagnose herangezogen werden. Ein Drittel der gestorbenen Kälber wies eine Rotfärbung der Kopfschleimhäute auf, während die restlichen zwei Drittel eine blassrosa bis weiße Färbung zeigten. Auch stellt sich in diesem Zusammenhang die Frage, ob ein klinisch als nicht septisch eingestuftes Tier aufgrund eines positiven Blutkulturbefundes umklassifiziert werden muss. Untersuchungen von LOFSTEDT (1999) zu Folge zeigen 31% der diarrhoeerkrankten Kälber einen septikämischen Verlauf. Allerdings sei hier kritisch bemerkt, dass nicht alle überlebenden Tiere in dieser Untersuchung mittels Blutkultur auf das Vorliegen von Bakterien im Blut getestet wurden und daher keine Aussage darüber möglich ist, wie hoch die Inzidenz einer bakteriellen Blutbesiedelung bei mild diarrhoeerkrankten Tieren tatsächlich ist.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass bei 100% der septisch und bei 77,3% der schwer einzelorganerkrankten Tiere bakterielle DNA mittels PCR im Blut aufzufinden war.

Die klinischen Parameter Puls, Atmung und Temperatur zeigen eine erwartungsgemäß niedrige Spezifität. Extrem hohe und niedrige Atemfrequenzen (<32 und >80 Züge pro Minute) konnten einzig und allein bei septisch- und schwer diarrhoeerkrankten Tieren gemessen werden. Bezüglich der Pulsfrequenz sind ebenfalls keine signifikanten Aussagen möglich. Die Betrachtung der

Körpertemperaturwerte zeigt, nur septisch und diarrhoeerkrankte Tiere weisen Werte unterhalb von 37,5°C auf. FECTEAU und Koautoren können im Zuge ihrer Untersuchungen 1997 ebenfalls keine signifikanten Puls-, Atmungs- und Temperaturwerte ermitteln.

In der Literatur zur Bedeutung des Gesamtproteingehaltes des Blutes als Maß für einen erfolgreichen Transfer von Immunglobulinen gelangen die verschiedenen Autorengruppen zu stark voneinander abweichenden Ergebnissen. Deshalb sollte im Zuge dieser Arbeit erneut getestet werden, ob der Gesamtproteingehalt als einfach und kostengünstig zu bestimmender Parameter richtungsweisende Ergebnisse liefern kann. So benutzten ALDRIDGE und Arbeitsgruppe 1993 die ermittelten Gesamtproteinwerte zur Beurteilung eines stattgefundenen Immunglobulintransfers. Er beurteilte Werte von <5 g/dl als niedrig, Werte von 5,0-5,9 g/dl als leicht erniedrigt und Werte >6,0 g/dl als adäquat. Dieser Bewertung und auch jener von ADAMS und Koautoren (1992) zu Folge hatte keines der Tiere dieser Untersuchung einen ausreichend hohen Gesamtproteingehalt. DONOVAN beurteilt jedoch 1998 Gesamtproteinwerte von 4,5-7,0 g/dl als physiologisch. Die Werte gesunder Kontrolltiere der vorliegenden Untersuchung liegen im Wertebereich von 5,6 g/dl, unmittelbar gefolgt von jenen Tieren, die eine chronische Erkrankung entwickelt haben (5,5 g/dl). Tiere, die an den Folgen der Erkrankung gestorben sind oder euthanasiert wurden zeigten Werte im Bereich zwischen 5,0 und 5,1 g/dl. Überraschend hingegen weisen die geheilten Kälber im Durchschnitt niedrige Werte (4,7 g/dl) auf. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens ergibt sich aus der Tatsache, dass es sich bei 10 der 21 geheilten Tiere um diarrhoeerkrankte Kälber handelte, die im Zuge ihrer Erkrankung zum Einen wenig Nahrung aufgenommen haben und zum Anderen einer stetigen Infusionstherapie unterzogen wurden, wodurch ein gewisser Verdünnungseffekt kombiniert mit einem chronischen Eiweißmangel als Ursache nicht auszuschließen. Diese Ergebnisse widersprechen den ermittelten Werten und daraus abgeleiteten Resultaten von den Arbeitsgruppen TENNANT (1975) und DONOVAN (1998). Beide stellten einen signifikant niedrigeren Gesamtproteingehalt des Blutes bei septisch erkrankten Tieren im Vergleich zu an

einer nicht septisch verlaufenden Diarrhoe fest. REA und Koautoren gelangen 1996 zu dem Ergebnis, dass weder durch die Bestimmung des Gesamtproteingehaltes, noch durch die Bestimmung des IgG-Gehaltes eine signifikante Aussage über das Schicksal des Tieres getroffen werden kann. In dieser Arbeit konnten keine signifikanten Unterschiede des Gesamtproteingehaltes zwischen den Gruppen Diarrhoe ($\bar{x}=56,4$, $\pm s=7,13$) und Sepsis ($\bar{x}=55,86$, $\pm s=4,97$) festgestellt werden.

Die Leukozytengesamtzahl im Blut der septisch erkrankten Kälber weist erhebliche Schwankungen auf (0,7-3,3 G/L). Auffällig ist, dass in keiner anderen Probandengruppe höhere oder niedrigere Werte gemessen werden konnten. Schwerwiegende Leukozytopenien mit weniger als 1,14 G/l und Leukozytosen oberhalb von 37,1 G/l fanden sich nur in der Gruppe septisch erkrankter Kälber. Die erhebliche Streuung der Leukozytenwerte zeigt, dass extrem hohe und extrem niedrige Leukozytenzahlen zwar hinweisend, nicht jedoch pathognostisch gewertet werden können.

Auch die in dieser Arbeit ermittelten Hämatokritwerte erlauben keinen Rückschluss auf die Erkrankungsform. Die Durchschnittswerte betragen in der Kontrollgruppe 0,32 l/l, in der Gruppe septisch erkrankter Tiere 0,29 l/l und bei den schwer einzelorganerkrankten Kälbern 0,33 l/l. Eine Bewertung dieser Ergebnisse wird auch durch den Umstand erschwert, dass diese lediglich den Status quo zum Messzeitpunkt wiedergeben. Nach eingeleiteter Infusionsbehandlung stellt sich vor allem bei schwerwiegend diarrhoeerkrankten Kälbern in Folge der Hämodilution eine zum Teil beträchtliche Senkung des Hämatokritwertes ein.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Sicherung einer klinischen Sepsisdiagnose beim bovinen Neonaten ist ein positiver Erregernachweis erforderlich. Bisher wird die Blutkultur als „gold standard“ betrachtet. Der zeitliche Abstand zwischen Probenentnahme und Vorliegen eines verwertbaren Ergebnisses ist jedoch so groß, dass eine sichere und zielgerichtete Versorgung eines erkrankten Kalbes erst nach einer erheblichen zeitlichen Verzögerung durchgeführt werden kann.

Die PCR hingegen ermöglicht den Nachweis bakterieller DNA im Blut innerhalb von 7-14 Stunden. In der vorliegenden Arbeit fanden dazu 16S-rRNA-Universalprimer Anwendung. Durch die Nutzung eines Polymerasekettenreaktion-Nachweises zur Detektion bakterieller DNA im Blutplasma und Leukozyten schwerwiegend erkrankter Kälber sollte ein Testverfahren etabliert werden, welches den Ansprüchen eines modernen, schnellen und zuverlässigen Untersuchungsverfahrens Rechnung trägt.

Insgesamt standen 126 Blutproben von 53 schwerwiegend erkrankten und 20 gesunden Kontrolltieren im Alter von 1 bis 23 Tagen verschiedener Rassen und Rassekreuzungen für diese Arbeit zur Verfügung. Die Einteilung erfolgte in die Gruppen „septisch erkrankte Tiere“, „schwer einzelorganerkrankte Tiere“ und „Kontrolltiere“. Die Gruppeneinteilung erfolgte anhand der klinischen Untersuchungsergebnisse. Die entnommenen Blutproben wurden parallel mittels Blutkultur und PCR analysiert.

Die blutkulturelle Untersuchung zeigte, dass *E.coli* bei 24,2% der 33 positiven Proben als ursächlicher Krankheitserreger in Reinkultur nachgewiesen werden konnte. Mit fünf positiven Einzelnachweisen und somit einem Anteil von 15,2% folgten die *Pseudomonas Species*. *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* sowie *Enterococcus*, *Corynebacterium* und *Neisseria Species* stellten jeweils einen Anteil von 6%.

Die mischkulturellen Nachweise in der Blutkultur erstreckten sich vor allem auf Vertreter der Gattung *Staphylococcus*, α -hämolyisierende Streptokokken, *Enterococcus* und *Acinetobacter Species*.

Im Zuge der molekularbiologischen Untersuchung der Kälberblutproben gelangten in 57 Fällen in den Leukozyten und 29 mal im Blutplasma positive Nachweise. 65 Blutproben enthielten weder im Plasma noch in den Leukozyten Spuren bakterieller DNA. Lediglich 5,8% der Proben wiesen Bakterienanteile im Blutplasma, nicht aber in den Leukozyten auf.

Von den insgesamt 126 untersuchten Proben zeigten 60 sowohl in der Blutkultur als auch in der PCR keinen Bakteriennachweis. Das positive Ergebnis von Blutkultur und PCR stimmt bei 28 Blutproben (69,8%) überein. Das positive Blutkulturergebnis von 5 Proben wurde nicht durch die PCR-Untersuchung bestätigt, woraus sich ein prozentualer Anteil von 4,0% ergibt. Jedoch konnte in 33 (26,2%) weiteren Proben bakterielle DNA mittels PCR entdeckt werden, welche nicht im Stande waren, Bakterienwachstum in der Blutkultur auszulösen. Der Anteil falsch positiver Proben beträgt für die Blutkultur 3%, für den PCR-Nachweis 4,9%.

Die statistische Auswertung bestätigte, dass sowohl der Zusammenhang als auch der Unterschied zwischen dem Ergebnis des Bakteriennachweises mittels Polymerasekettenreaktion und Blutkultur signifikant sind (jeweils $p < 0,001$).

Zur genaueren Beurteilung von wahr und falsch positiven Proben wurde retrospektiv das Schicksal der einzelnen Kälber bewertet. Nur ein blutkultureller Nachweis von *Staphylococcus intermedius* und drei PCR-Ergebnisse bei klinisch gesunden Kontrolltieren konnten eindeutig als falsch positiv bewertet werden.

Ein statistisch signifikanter Einfluss einer antibiotischen Behandlung auf die Untersuchungsergebnisse der Blutkultur und PCR ließ sich nicht nachweisen.

Die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit zeigen des Weiteren, dass bei 73,7% der klinisch als septisch eingestuftten Kälber bereits nach *einer* Blutuntersuchung

mittels PCR Bakterienbestandteile entdeckt werden konnten, während dies bei der Blutkultur nur 47,4% waren. Nach Berücksichtigung von zwei Blutuntersuchungen zeigten 100% der septisch eingestuften Kälber positive PCR-Ergebnisse, mittels Blutkultur jedoch nur 61,5%. In der Gruppe der schwer einzelorganerkrankten Kälber war ebenfalls zu beobachten, dass ein größerer Anteil von Tieren bereits nach einer PCR-Untersuchung positive Resultate vorwies (58,8%) als nach zwei Untersuchungen mittels Blutkultur (54,5%). Das bedeutet eine statistisch signifikante Steigerung des prädiktiven Wertes bereits nach einer Blutuntersuchung ($p < 0,001$).

Durch den Einsatz der PCR zur Feststellung einer Bakteriämie bei septisch erkrankten Kälbern liegt ein repräsentatives Ergebnis in erheblich kürzerer Zeit vor.

7 SUMMARY

The affirmation of a clinical sepsis diagnosis in neonatal calves requires a positive evidence of pathogens. So far the blood culture has been considered as 'gold standard'. Due to the considerable time gap between the set up and the results blood culture is rarely been exercised whereas the PCR allows proof of bacterial DNA in the blood within a few hours. For this study broad-range primers targeting an conserved region of bacterial DNA that codes for the 16S-ribosomal DNA have been used to detect bacteria in both plasma and leukocytes.

A total of 126 blood samples collected from 53 critically ill as well as 20 healthy control calves at the age of 1 to 23 days of different breeds and cross-breeds had been at disposal for this study. The calves were classified, according to the clinical results, in three groups: clinically septic, seriously single organ deceased and control calves. The blood samples taken of the animals had been simultaneously examined by blood culture and PCR. The bacteriological culture of blood gave evidence that *E.coli* had been the etiological pathogen in 24.2% of 33 positive samples. Second with 5 positive results (15.2%) had been *Pseudomonas species*. *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* as well as *Enterococcus*, *Corynebacterium* and *Neisseria species* had a quota of 6% each. Polymicrobial growth was observed in six cases. Bacterial combinations isolated in this study were mainly Staphylococci, α -hemolytic Streptococci, *Enterococcus* and *Acinetobacter species*.

In the course of the molecular biological examination of the calf blood samples positive evidence was to be achieved in leukocytes in 57 cases and in blood plasma in 29 cases. 65 of the samples contained neither in plasma nor in leukocytes any traces of bacterial DNA. Only 5.8% of the samples presented bacterial DNA in the blood plasma but not in the leukocytes. 60 of the total of 126 samples examined showed no evidence of bacteria, neither in blood culture nor in PCR. The positive results of blood culture and PCR matched in 28 cases of the blood tests (69.8%). In 5 cases (4.0%) the positive result of blood culture had not

been corroborated by PCR examination. Yet in more 33 cases (26.2%) it was possible to detect bacterial DNA by means of PCR, which was not capable of causing an increase of bacteria in the blood culture. The percentage of false positive results using blood culture can be stated 3%, for PCR 4.9%.

The statistical evaluation confirms the assumption that the connection as well as the differences between the results of the bacterial evidence by means of PCR and in comparison by means of blood culture have to be described as significant ($p < 0.001$).

For a more exact evaluation of true and false positive tests the fate of the calves has been evaluated in retrospect. Only one blood evidence of *Staphylococcus intermedius* and three PCR results of clinical healthy control animals could be explicitly proven to be false positive. A statistically significant influence of a treatment with antibiotics on the results of blood culture and PCR was not be detected.

Further the results of this study demonstrate that in 73.7% of cases which were classified as septic in clinical terms it was possible to provide evidence of bacterial components by using PCR whereas the hit rate using blood culture measured only 47.4%. In consideration of two blood examinations 100% of the calves classified as septic showed positive PCR-results but only 61.5% were detected by using blood culture. In the group of seriously single organ diseased calves it was also to be observed that the positive results received by only one PCR examination (58.8%) outnumbered the positive results gained by two blood cultural examinations (54.5%) slightly. It is concluded that the use of PCR to detect bacteriemia in suspected septic neonatal calves was significantly more sensitive than conventional blood culture techniques ($p < 0.001$).

Using PCR for the diagnosis of a bacteremia in calves with suspected sepsis leads to representative results in considerable less time compared to blood culture.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS R, GARRY FB, ALDRIDGE BM, HOLLAND MD (1992)
Hematologic values in newborn beef calves
Am J Vet Res; 53: 944-950
- ACCP/SCCM (1992)
Consensus Conference
Crit Care Med; 20: 864-874
- ALDRIDGE BM, GARRY FB, ADAMS R (1993)
Neonatal septicemia in calves: 25 cases (1985-1990)
J Am Vet Med Assoc; 203: 1324-1329
- AMANN RI, LUDWIG W, SCHLEIFER KH (1995)
Phylogenetic Identification and In Situ Detektion of Individual Microbial
Cells without Cultivation
Microbiol Rev; 59: 143-169
- ARONSON MD, BOR DH (1987)
Blood cultures
Ann Intern Med; 106: 246-253
- BAGGLIONI M (1989)
Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates
neutrophils
J Clin Invest; 84: 1045
- BALJER G (1985)
Pathogenese, Klinik und Diagnose der wichtigsten bakteriell bedingten
Enteritiden beim Tier
Tierärztl Prax; 13: 141-150
- BALJER G, BAUERFEIND R (1999)
Tiere als Infektionsquelle für den Menschen - durch EHEC hervorgerufene
Erkrankungen
Dtsch Tierärztl Wschr; 106: 309-372
- BANKS KL (1982)
Host defense in the newborn animal
J Am Vet Med Ass; 181: 1053-1056

BATES DW, SANDS K, MILLER E, LANKEN PN, HIBBERD PL, GRAMAN PS, SCHWARTZ JS, KAHN K, SNYDMAN DR, PARSONNET J, MOORE R, BLACK E, JOHNSON BL, JHA A, PLATT R (1997)

Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome
J Infect Dis; 176: 1538-1551

BAUE AE (1992)

The horror autotoxicus and multiple-organ failure
Arch Surg 1992; 127: 1451-1462

BERCHTOLD M, ZAREMBA W, GRUNERT E (1990)

Kälberkrankheiten
In: Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere, Hrsg. K. Walser und H. Bostedt,
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart

BERTIN Y, GIRARDEAU JP, DARFEUILLE-MICHAUD A, MARTIN C (2000)

Epidemiological study of pap genes among diarrheagenic or septicemic Escherichia coli strains producing CS31A and F17 adhesins and characterization of Pap(31A) fimbriae
J Clin Microbiol; 38: 1502-1509.

BEUTLER B, GRAU GE (1993)

Tumor necrosis factor in the pathogenesis of infectious diseases
Crit Care Med; 21: 423-434

BLEUL U (1998)

Hämatologische Verlaufsuntersuchungen bei Rindern post partum-gleichzeitig eine Überprüfung des Hämatologieanalyzesystems Cell-Dyn 3500®
Diss med vet, Gießen

BLEUL U, SOBIRAJ A, BOSTEDT H (2002)

Evaluation of the cell-Dyn 3500 haematology analyser for bovine blood
Comp Clin Patho; 4: 201-210

BONE RC, BALK RA, CERRA FB, DELLINGER RP, FEIN AM, KNAUS WA, SCHEIN RMH, SIBBALD WJ (1992)

Definitions for sepsis and organe failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis
Chest; 101: 1644-1655

BONE RC, BALK RA, CERRA FB, DELLINGER RP (1991)

American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis
Crit Care Med; 20: 864-875

- BONE RC, FCCM (1991)
Let's agree on terminology: Definitions of sepsis
Crit Care Med; 19: 973-976
- BONE RC, GRODZIN CJ, BALK RA (1997)
Sepsis: A new hypothesis for pathogenesis of the diseases process
Chest; 112: 235-243
- BOSTEDT H, BERCHTOLD M (1968)
Veränderungen der Glucose-Konzentration und der Zahl der eosinophilen
Leukozyten im Blut von Rindern intra und post partum
Berl Münch Tierärztl Wschr; 81: 243-245
- BOSTEDT H, WAGENSEIL F, GARHAMMER M (1974)
Untersuchungen über den Eisen- und Kupfergehalt im Blutserum sowie
über das rote Blutbild des Rindes während der Gravidität und in der Zeit um
die Geburt
Zuchthyg;9: 49-57
- BOSTEDT H, JECKEL E, SCHRAMMEL P (1990)
Zur Entwicklung der Eisen- und Kupferkonzentration im Blutplasma von
Kälbern in den ersten Lebenstagen und -wochen, gleichzeitig ein Beitrag
zur larvierten neonatalen Eisenmangelanämie
Dtsch Tierärztl Wschr; 97: 400-403
- BURKE F, NAYLOR B, DAVIS F, BALKWILL F (1993)
The cytokine wall chart
Immunol Today; 14: 165-170
- CECYRE A, PAUL M, COUTURE Y, LAMOTHE P (1981)
Salmonella choleraesuis septicemia in calf
Can Vet J; 22: 269-270
- COHEN J, ABRAHAM E (1999)
Microbiologic findings and correlations with serum tumor necrosis factor in
patients with severe sepsis and septic shock
J Inf Dis; 180: 116-121
- CONTREPOIS M, DUBOURGUIER HC, PARODI AL, GIRARDEAU JP,
OLLIER JL (1986)
Septicaemic Escherichia coli and experimental infection of calves
Vet Microbiol; 12: 109-118
- CURSONS RT, JEYERAJAH E, SLEIGH JW (1999)
The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill
patients
Crit Care Med; 27: 937-940

-
- DEBEY BM, BLANCHARD PC, WALKER RL (1996)
Actinobacillus suis-like organisms associated with septicemia in neonatal calves
J Vet Diagn Invest; 8: 248-250
- DIXON WJ (1993)
BMDP Statistical Software Manual, Volume 1 and 2. University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London
- DONOVAN GA, DOHOO IR, MONTGOMERY DM, BENNETT FL (1998)
Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida, USA
Prev Vet Med; 33: 1-10
- DONOVAN GA, DOHOO IR, MONTGOMERY DM, BENNETT FL. (1998)
Associations between passive immunity and morbidity and mortality in dairy heifers in Florida, USA
Prev Vet Med; 34: 31-46
- EHL S, GERING B, BARTMANN P, HÖGEL J, POHLANDT F (1997)
C-Reactive Protein is a useful marker for guiding duration of antibiotic therapy in suspected neonatal bacterial infection
Pediatrics; 99: 216-221
- EDER H, FRITSCHE H (1986)
Automatisation in der hämatologischen Diagnostik: Entwicklungsstand der Geräte zum Zählen und Differenzieren von Blutzellen
Tierärztl Prax; 14: 417-429
- EDER H (1987)
Blut und Lymphe
In: A. Scheunert und A. Trautmann: Lehrbuch der Veterinär-Physiologie, 7. Auflage, 160-207, Paul-Parey Verlag, Berlin und Hamburg
- FAUST SN, HEYDERMAN RS, LEVIN M (2001)
Coagulation in severe sepsis: A central role for thrombomodulin and activated protein C
Crit Care Med; 29: 62-66
- PECTEAU G, FAIRBROTHER JM, HIGGINS R, VAN METRE DC, PARE J, SMITH BP, HOLMBERG CA, JANG S (2001)
Virulence factors in Escherichia coli isolated from the blood of bacteremic neonatal calves
Vet Microbiol; 78: 241-249

FECTEAU G, PARE J, VAN METRE DC, SMITH BP, HOLMBERG CA, GUTERBOCK W, JANG S (1997)

Use of a clinical sepsis score for predicting bacteremia in neonatal dairy calves on a calf rearing farm

Can Vet J; 38: 101-104

FECTEAU G, VAN METRE DC, PARE J, SMITH BP, HIGGINS R, HOLMBERG CA, JANG S, GUTERBOCK W (1997)

Bacteriological culture of blood from critically ill neonatal calves

Can Vet J; 38: 95-100

FRANZ AR, STEINBACH G, KRON M, POHLANDT F (1999)

Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using Interleukin-8 and C-Reactive Protein as markers of bacterial infections

Pediatrics; 3: 447-453

FUNG JC, TILTON RC (1985)

Detection of bacterial antigens by counterimmunophoresis, coagglutination and latex agglutination

Am Society for Microbiol; 1985: 883-890

GLAUSER MP, ZANETTI G, BAUMGARTNER JD, COHEN J (1991)

Septic shock: Pathogenesis

Lancet; 338: 732-736

GOEL VK, KAPIL A (2001)

Monoclonal antibodies against the iron regulated outer membrane proteins of *Acinetobacter baumannii* are bactericidal

BMC Microbiol; 1: 1-16

GORMAN SK, ZED PJ, DHINGRA VK, RONCO JJ (2003)

Rapid Imipenem/ Cilastatin Desensitization for Multidrug- Resistant *Acinetobacter* Pneumonia

Ann of Pharmacotherapy; 37: 513-516

GREISEN K, LOEFFELHOLZ M, PUROHIT A, LEONG D (1994)

PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid

J Clin Microbiol; 32: 335-351

GRINNELL BW, JOYCE D (2001)

Recombinant human activated protein C: A system modulator of vascular function for treatment of severe sepsis

Crit Care Med; 29: 53-59

-
- HOLSTEG M (2002)
Softwareadaptation und begleitende Evaluation des Hämatologiesystems ADVIA 120 für die Tierart Rind; Erstellung von hämatologischen Referenzbereichen für die Rinderrassen schwarzbunte Holstein und das Deutsche Fleckvieh.
Diss med vet, Gießen
- HUANG YC, SU LH, WU TL, LEU HS, HSIEH WS, CHANG TM, LIN TY (2002)
Outbreak of *Acinetobacter baumannii* bacteremia in a neonatal intensive care unit: clinical implications and genotyping analysis
Ped Inf Dis J; 21: 1105-1109
- JACCOUD J (1887)
Pyämie der neugeborenen Kälber
Dtsch Zeitschrift für Thiermedizin, ohne Bandangabe: 112
- JAIN NC (2001)
Essentials of Veterinary Hematology
Lea & Febiger, Philadelphia
- JOYCE RA, BOGGS DR, HASIBA U, SRODES CH (1976)
Marginal neutrophil pool size in normal subjects and neutropenic patients as measured by epinephrine infusion
J Lab Clin Med; 88: 614-620
- KANE TD, ALEXANDER JW, JOHANNIGMAN JA (1998)
The detection of microbial DNA in the blood: a sensitive method for diagnosing bacteremia and/ or bacterial translocation in surgical patients
Ann Surg; 227: 10-11
- KANEKO (1989)
Serum proteins and the dysproteinemias.
In: Kaneko: Clinical Biochemistry of Domestic Animals
4. Auflage, Acad. Press
- KASTNER U, GLASL S, LUGAUER S, GUGGENBICHLER JP (2001)
Sepsis-Neue Erkenntnisse zur Pathogenese, Therapie und Prävention
Antib Mon (htm); 4: 1-19
- KISHIMOTO T (1989)
The biology of interleukin-6
Blood; 74: 1-10
- KLUGE JP, PERL S (1992)
Erysipelothrix rhusiopathiae septicemia-polyserositis and streptococcal encephalitis in a calf.
J Vet Diagn Invest; 4: 196-197

- KRAFT W, DÜRR U, KLEE W, BOSTEDT H, HEINRITZI K, (1997)
10. Hämatologie
In: KRAFT W, DÜRR U, Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin
4. Aufl., Schattauer Verlag Stuttgart, New York
- KURLAT I, STOLL BJ, MCGOWAN JE JR, (1989)
Time to positivity for detection of bacteremia in neonates
J Clin Microbiol; 27: 1068-1071
- LAFORGIA N, COPPOLA B, CARBONE R, GRASSI A, MAUTONE A,
IOLASCON A (1997)
Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction
Acta Pediatr; 86: 1097-1099
- LEHNINGER AL (1998)
In: Lehninger ; David L. Nelson ; Michael M. Cox
Prinzipien der Biochemie, 2. Aufl. 1998
Spektrum-Lehrbuch
- LEWIN RA, HUGHES WT (1966)
Neisseria subflava as a cause of meningitis in children. Report of five
cases.
J Am Med Assoc; 10: 821-823
- LEWIN B (1998)
In: Benjamin Lewin
Molekularbiologie der Gene, 1. Aufl. 1998
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg - Berlin
- LEY BE, LINTON CJ, BENNETT DM, JALAL H, FOOT AB, MILLAR MR (1998)
Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S
rRNA gene amplification by polymerase chain reaction
Eur J Clin Microbiol Infect Dis; 17: 247-253
- LOFSTEDT J, DOHOO IR, DUIZER G (1999)
Model to predict septicemia in diarrheic calves
J Vet Intern Med; 13: 390-391
- MAYR A (2002)
In: ROLLE M, MAYR A, (2002)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage
1. Kapitel: Grundlagen der Allgemeinen Medizinischen Mikrobiologie,
Infektions- und Seuchenlehre
Enke Verlag Stuttgart

-
- MOLLA A (1978)
Immunglobulin levels in calves fed colostrum by stomach tube
Vet Rec; 103: 377-380
- MORITZ A (2000)
Der Einsatz lasergestützter Multiparameter-Hämatologiesysteme in der
Veterinärmedizin
Habilitationsschrift med vet, Gießen
- MULLIS KB, FALOONA F, SCHARF SJ, SAIKI RK, ERLICH HA (1986)
Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain
reaction
Cold Spring Harbor Symp Quant Biol; 51: 263-273
- MULLIS KB, FALOONA F (1987)
Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain
reaction
Methods in Enzymology; 155: 355-350
- MULLIS KB (1990)
The unusual origin of the polymerase chain reaction
Scientific American; 4: 56-65
- MURRAY PR, HOLLICK GE, JERRIS RC, WILSON ML (1998)
Multicenter comparison of BACTEC 9050 and BACTEC 9240 blood culture
systems
Clin Microbiol; 36: 1601-1603
- OPPENHEIM J (1991)
Properties of the novel proinflammatory supergene „intercrine“ cytokine
family
Annu Rev Immunol; 9: 617-648
- PAHLKE K, OBERHOFFER M, MEIER-HELLMANN A, REINHART K (1997)
Procalcitonin - Eigenschaften eines neuen Parameters bei schweren
bakteriellen Infektionen und Sepsis
Intensivmed; 34:381-387
- PIRRO F, WIELER LH, FAILING K, BAUERFEIND R, BALJER G (1995)
Neutralizing antibodies against Shiga-like toxins from Escherichia coli in
colostra and sera of cattle
Vet Microbiol; 43: 131-141
- RACKOW EC, ASTIZ ME (1991)
Pathophysiology and treatment of septic shock
J Am Med Assoc; 266: 548-554

REA DE, TYLER JW, HANCOCK DD, BESSER TE, WILSON L, KRYTENBERG DS, SANDERS SG (1996)

Prediction of calf mortality by use of tests for passive transfer of colostral immunoglobulin

J Am Vet Med Assoc; 208: 2047-2049

REBHUN WC (1976)

Erysipelotrix isidiosa septicemia in neonatal calves

Vet Med Small Anim Clin; 71: 684-686

REISS I, BORKHARDT A, FUSSLE R, SZIEGOLEIT A, GORTNER L (2000)

Desinfectant contaminated with Klebsiella oxytoca as a source of sepsis in babies

Lancet; 356: 310

RELLER L, MURRAY P, MCLOWRY J, CUMITECH LA (1982)

Blood cultures II

American Society for Microbiology; 1982: 1-11

RENO WL, McDANIEL DO, TURNER WW, WILLIAMS MD (2001)

Polymerase chain reaction for the detection of bacteremia

Am Surg; 67: 508-512

ROBERTS DH, LUCAS MH (1986)

Control of diarrhoea and septicaemia in colostrum deprived calves

Vet Rec; 119: 459

RODRIGUEZ-GASPAR M, SANTOLARIA F, JARQUE-LOPEZ A, GONZALES-REIMERS E, MILENA A, VEGA MJ, RODRIGUEZ-RODRIGUEZ E, GOMEZ-SIRVENT JL (2001)

Prognostic value of cytokines in SIRS general medical patients

Cytokine; 4: 232-236

ROOS R, GENZEL-BOROVICZENY O, PROQUITTE H (2000)

Checkliste Neonatologie, 2000

Georg Thieme Verlag Stuttgart

SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988)

Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase

Science; 239: 487-491

SAWHNEY D, HINDER S, SWAINE D, BRIDSON E Y (1986)

Novel method for detecting micro-organisms in blood cultures

J Clin Pathol; 39: 1259-1263

-
- SEIMIYA Y, OHSHIMA K, ITOH H, MURAKAMI R, HARITANI M (1993)
A case of neonatal calf with meningitis associated with *Klebsiella oxytoca* infection
J Vet Med Sci; 55: 141-143
- SEIMIYA Y, OHSHIMA K, ITOH H, MURAKAMI R (1992)
Listeric septicemia with meningitis in a neonatal calf
J Vet Med Sci; 54: 1205-1207
- SELBITZ HJ (2002)
In: ROLLE M, MAYR A, (2002)
Medizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 7. Auflage
5. Kapitel: Bakterielle Krankheiten der Tiere
Enke Verlag Stuttgart
- SLEIGH J, CURSONS T (2000)
Generic polymerase chain reaction followed by DNA sequencing as a means of diagnosing bacteraemia
Anaest Intensive Care; 28: 54-57
- SLEIGH J, CURSONS T, LA PINE M (2001)
Detection of bacteraemia in critically ill patients using 16S rDNA polymerase chain reaction and DNA sequencing
Intensive Care Med; 27: 1269-1273
- SOBJINSKI G, WIELER LH, FAILING K, BALJER G (1996)
Monitoring von Shiga-like-Toxin-bildenden *E. coli* (SLTEC) bei Kälbern (1.-12. Lebenswoche) aus Milchviehbeständen mittels PCR
Dtsch Vet med Ges (DVG), Fachgruppe "Epidemiologie und Dokumentation" : Quantitative Verfahren für Monitoring und Bekämpfung infektiöser Krankheiten Gießen, 30.8.-1.9.1995: 170-177
- STENGEL KH (1998)
Immunglobulin G-Bestimmung im Blutserum neugeborener Kälber in den ersten zehn Lebenstagen sowie im Kolostrum derer Mütter mittels ELISA
Diss med vet, Gießen
- STEPHENS DS, ZIMMER SM (2002)
Pathogenesis, therapy and prevention of Meningococcal sepsis
Curr Infect Dis Rep; 4: 377-386
- STOLL-BECKER S, REISS I, MISSELWITZ B, KUGLER C, MÖLLER J, GORTNER L (2000)
Neonatale Sepsis: Vergleich der Neonatalstatistiken Hessens und Schleswig-Holsteins von 1993-1998
ZGN 2000 Thema: Wissenschaftliches Programm Poster

- TANNER A, MAIDEN MF, PASTER BJ, DEWHIRST FE (1994)
The impact of 16S ribosomal RNA-based phylogeny on the taxonomy of oral bacteria
Periodontol 2000; 5: 26-51
- TENNANT B, HARROLD D, REINA-GUERRA M (1975)
Hematology of the neonatal calf. II. Response associated with acute enteric infections, gram-negativ septicemia, and experimental endotoxemia
Cornell Vet; 65: 457-475
- THEAKER C; AZADIAN B; SONI N (2003)
The impact of Acinetobacter baumannii in the intensive care unit
Anaesthesia; 58: 271-274
- THUN R, SCHWARZ-PORSCHKE D (1994)
13. Nebennierenrinde
In: Döcke, E. : Veterinärmedizinische Endokrinologie
Gustav-Fischer Verlag Jena Stuttgart
- TÖLLNER B (2002)
Untersuchungen zur Rolle von Tumor Nekrose Faktor, Interleukin-1, induzierbare NO-Synthase und induzierbare Zyklooxygenase in einem Sepsis-Modell bei Ratten
Diss med vet, Gießen
- UFFREDUZZI J (1887)
Die chronische Pyämie der Kälber
Centralblatt; ohne Bandangabe; S.403
- VAN DER HEIJDEN IM, WILBRINK B, VIJE AE, SCHOULS LM, BREEDFELD FC, TAK PP (1999)
Detection of bacterial DNA in serial synovial samples obtained during antibiotic treatment from patients with septic arthritis
Arthritis Rheum; 42: 2198-2203
- VAN NIEUWENHOVEN EJ, LEFERING R, NEUGEBAUER E (1998)
Clinical relevance of sepsis scores
Langenbeck's Arch Surg; 383: 11-14
- VIRTALA AM, MECHOR GD, GROHN YT, ERB HN (1996)
Morbidity from nonrespiratory diseases and mortality in dairy heifers during the first three months of life
J Am Vet Med Assoc; 208: 2043-2046

-
- VOGT-HELLMUTH B (1996)
Gensonden für die Diagnostik von tiermedizinisch relevanten bakteriellen Infektionserregern
Diss med vet, Gießen
- WASHINGTON JA, ILSTRUP DM (1986)
Blood cultures: issues and controversies
Rev Infect Dis; 8: 792-802
- WALSER K, BOSTEDT H (1990)
Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere
Ferdinand Enke Verlag Stuttgart
- WALSER K. (1973)
Entstehung und Verhütung von Kälberkrankheiten
Tierärztl Prax; 1: 25-32
- WEINSTEIN MP, RELLER LB, MURPHY JR, LICHTENSTEIN KA (1983)
The clinical significance of positiv blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults: I. Laboratory and epidemiologic observations
Rev Infect Dis; 5: 35-53
- WICHELHAUS TA, SCHÄFER V, BRADE V (1999)
Keimnachweis in der Blutkultur – Kontamination, Kolonisation oder Infektion
Zbl Chir; 124: 699-702
- WILBRINK B, VAN DER HEIJDEN I, SCHOULS L, VAN EMBDEN J, HAZES J, BREEDVELD F, TAK P (1998)
Detection of bacterial DNA in joint samples from patients with undifferentiated arthritis and reactive arthritis, using polymerase chain reaction with universal 16S ribosomal RNA primers
Arthritis Rheum; 41: 535-543
- WILSON ML, WEINSTEIN MP, MIRRETT S, REIMER LG, FERNANDO C (2000)
Comparison of iodophor and alcohol pledges with the Medi-Flex Blood Culture Prep Kit II for preventing contamination of blood cultures
J Clin Microbiol; 38: 4665-4667
- WILSON WR, VAN SCOY RE, WASHINGTON JA (1975)
II. Incidence of bacteremia in adults without infection
J Clin Microbiol; 2: 94-95
- WOESE CR (1987)
Bacterial Evolution
Microbiol Rev; 51: 221-271

WOESE CR, WINKER S, GUTELL RR (1990)

Architecture of ribosomal RNA: Constraints on the sequence of "tetra-loops"
Proc Natl Acad Sci; 87: 8467-8471

WOESE CR (2002)

On the evolution of cells
Proc Natl Acad Sci; 99: 8742-8747

ZAREMBA W, GRUNERT E, HEUWIESER W, SCHIFFNER-MEHRENS H (1985)

Untersuchungen über die Immunglobulinabsorption bei Kälbern nach
Verabreichung von Kolostrum per Schlundsonde im Vergleich zur
freiwilligen Aufnahme
Dtsch Tierärztl Wschr; 92: 18-20

9 ANHANG

Verwendete Gerätschaften und Substanzen

Substanz/Gerätschaft	Hersteller, Ort
Aerosol Resistant Tips (ART)	Molecular BioProducts, San Diego, USA
AmpliTaq Polymerase (5 U/ μ l)	Roche, New Jersey, USA
<i>Aqua bidestillata</i>	Roth, Karlsruhe
Blue Run	Roth, Karlsruhe
CELL-DYN 3500 Hämatologieanalyzesystem	Abbott Diagnostika GmbH, Wiesbaden- Delkenheim
dNTP (10mM)	Roth, Karlsruhe
Downstream- Primer	Roth, Karlsruhe
EBA 12 R	Hettich, Tuttlingen
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Elektrophoresekammer	Owl Separation Systems, Portsmouth, USA
Ethanol, 96-100%ig	Riedel-de Haën AG, Seelze
Ethydiumbromid	Roth, Karlsruhe
Gel-Belichter FotoPrepl, Fotodyne	Biometra, Göttingen
Handschuhe, Sensi clean	Ansell, München
Lysozym	Roth, Karlsruhe
Micro Tubes	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrowelle	Siemens, München
MgCl-Solution (25 mM)	Roche, New Jersey, USA
Pipetten, Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polymerase AmpliTaq	Roche, New Jersey, USA
Primer	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Quiagen GmbH, Hilden
Puffer (10x PCR Buffer II)	Roche, New Jersey, USA
Qiagen QLAmp DNA Extraktionskit	Hombrechtikon, Schweiz
RBCLS	eigene Herstellung

Substanz/ Gerätschaft	Hersteller
Refraktometer, HRM-18, Hand-Refraktometer NO.19540	Krüss, Hamburg
Rotanta 96 R	Hettich, Tuttlingen
Safe-lock Tubes	Eppendorf, Hamburg
Sicherheitsmonovette	Sarstedt, Nümbrecht
SIGNAL Blutkultursystem BC 100	Oxoid, Wesel
Skinsept G Lösung	Henkel, Düsseldorf
Standard, 100 base pair ladder, DNA molecular weight marker XIV	Roche Diagnostics, Mannheim
TAE-Lösung UV-Safe-TAE Fertigpufferlösung	MWG-Biotech, Munchenstein, Schweiz
Thermal Cycler GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmer, Überdingen
Thermoprinter, Digital Graphic Printer UP-D860E	Sony, Köln
Upstream- Primer	Roth, Karlsruhe
Vacurette	Greiner, Kremsmüster, Österreich
Vortex 2 Genie	Scientific Industries, New York, USA

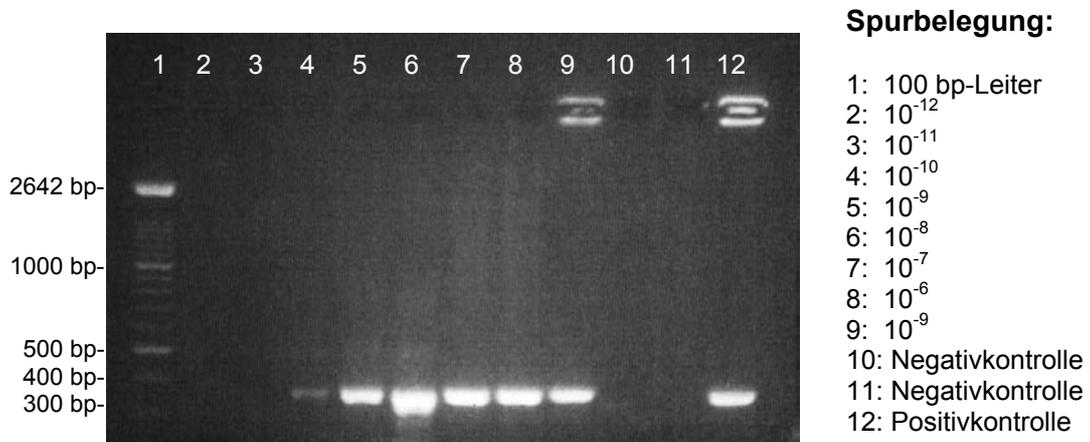


Bild 1: Agarosegelelektrophorese der Verdünnungsstufen von *E. coli*

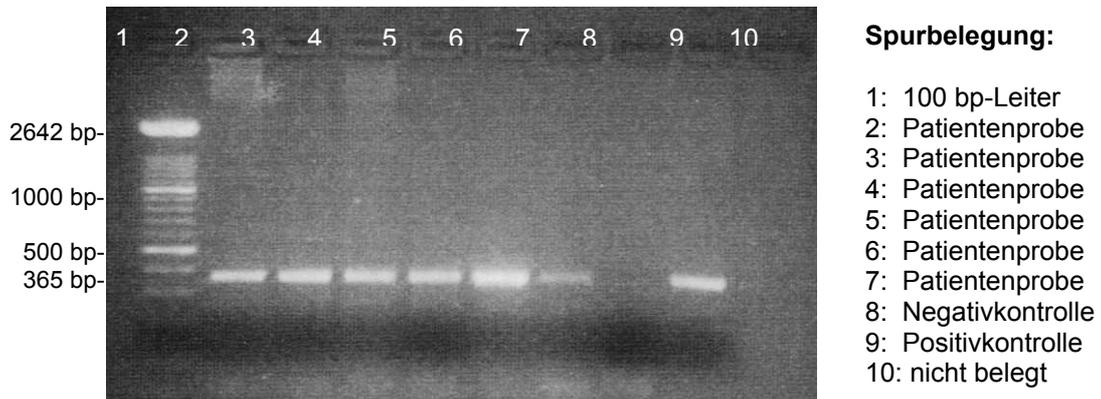


Bild 2: Agarosegelelektrophorese verschiedener Patientenproben

Danksagung

Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt gilt mein ganz besonderer Dank für die Überlassung des Themas sowie die geduldige und unermüdliche Unterstützung und Hilfestellung bei der Planung und Fertigstellung dieser Arbeit. Weiterhin sei ihm nicht nur für die wissenschaftliche, sondern auch für die klinische Ausbildung gedankt, die er mir in der Klinik ermöglichte.

Prof. Dr. L. Gortner möchte ich für die Möglichkeit zur Nutzung des Genlabores der Kinderklinik zur Durchführung der molekularbiologischen Blutuntersuchungen und sein Interesse an tiermedizinischen Fragestellungen, auch im Rahmen der interdisziplinären Arbeitsgruppe Perinatalogie/Neonatalogie, danken.

Dr. Rainer Hospes und Dr. Birgit Hospes als Bindeglieder zwischen den beiden Kliniken (Tierklinik und Kinderklinik) ist es letztendlich zu verdanken, dass diese Arbeit überhaupt durchführbar war. Meinen herzlichen Dank an Dr. Rainer Hospes für die fortwährende Betreuung und Unterstützung bei der Ausarbeitung des Themas und Dr. Birgit Hospes für die freundliche Einarbeitung und die fachliche Betreuung im Genlabor der Kinderklinik.

Einen herzlichen Dank an das Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Haustiere (geschäftsführender Direktor Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer) für die unermüdliche Untersuchung meiner Blutkulturen. Für die freundliche Aufnahme, die Unterstützung und Anleitung bei der Durchführung der Untersuchungen sowie das Teilhaben an der Suche nach Lösungen von größeren und kleineren Problemen möchte ich mich vor allem bei Dr. Astrid Thöle und Dr. R. Weiß bedanken!

Ebenfalls danken möchte ich Dr. K. Failing und Herrn H. Heiter von der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung für die statistische Auswertung.

Zuletzt, aber ganz besonders, möchte ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bei meinen Eltern, der gesamten Familie und meinem Freund Exxi, ganz herzlich für ihre Unterstützung bedanken.

Danke!