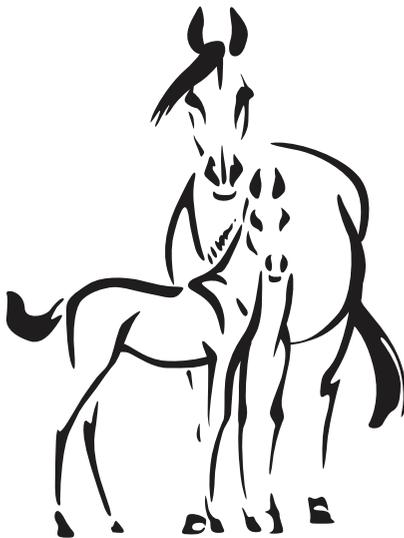


MAREN SIEVERT

Immunglobuline im Blut neugeborener Fohlen -
Etablierung eines ELISAs und vergleichende
Untersuchungen zu verschiedenen Messverfahren
sowie Evaluierung der Plasmatransfusion



Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autoren dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2023

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1st Edition 2023

© 2023 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, 35396 GIESSEN, GERMANY
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und
Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig- Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Axel Wehrend

**Immunglobuline im Blut neugeborener Fohlen - Etablierung eines
ELISAs und vergleichende Untersuchungen zu verschiedenen
Messverfahren sowie Evaluierung der Plasmatransfusion**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Maren Sievert

Tierärztin aus Soest

Gießen 2022

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Gutachter: Prof. Dr. Axel Wehrend
Prof. Dr. Kerstin Fey

Tag der Disputation: 28.02.2023

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung und Fragestellung.....	1
2	Literaturübersicht	3
2.1	Publikation 1.....	3
3	Material/Methode und Ergebnisse	13
3.1	Publikation 2.....	13
3.2	Publikation 3.....	21
4	Diskussion.....	27
4.1	Diskussion der Fragestellung.....	27
4.1.1	Stellenwert der Immunglobulin-Bestimmung in der equinen Neonatologie	27
4.1.2	Notwendigkeit des Vergleichs der drei verwendeten Testverfahren	27
4.1.3	Stellenwert der Plasmatransfusion in der equinen Neonatologie	29
4.1.4	Notwendigkeit der Evaluierung der Plasmatransfusion	30
4.2	Diskussion der Methode.....	31
4.2.1	Literaturübersicht.....	31
4.2.2	Studienpopulation	32
4.2.3	Kontrollproben und Testevaluierung.....	33
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	34
4.3.1	Vergleich der drei Testmethoden	35
4.3.2	Überprüfung der Plasmatransfusion.....	37
4.4	Ausblick.....	38
5	Zusammenfassung.....	40
6	Summary.....	42
7	Literaturverzeichnis	44

8	Selbstständigkeitserklärung	50
9	Danksagung	51
10	Anhang	53

Abkürzungsverzeichnis

et al.	et alii
dl:	Deziliter
ELISA:	enzym linked immunosorbend assay
FPT:	fehlerhafter passiver Transfer
g:	Gramm
HGG:	Hypogammaglobulinämie
IgG:	Immunglobulin G
l:	Liter
mg:	Milligramm
RID:	radiale Immundiffusion
SNAP-Test:	SNAP® Foal IgG Test Kit (Idexx Laboratories)
Tab:	Tabelle
TP:	Totalprotein
TP-A:	Immunglobulinbestimmung aus der Differenz von Totalprotein und Albumin

1 Einleitung und Fragestellung

Equines Kolostrum besitzt für neugeborene Fohlen eine herausragende Bedeutung. Da diese aufgrund des epithelio-chorealen Plazentationstypes der Stute nahezu agammaglobulinämisch geboren werden, ist die Aufnahme von Kolostrum essentiell für den neonatalen Organismus (Raidal, 1996). Das Immunglobulin G (IgG) bildet dabei die Hauptfraktion. Die durch Pinozytose im Dünndarm des Fohlens aufgenommenen Immunglobuline gelangen über das Lymphsystem in den Blutkreislauf (Jeffcott, 1975). Diese Aufnahme ist zeitlich begrenzt und findet innerhalb der ersten 24 Lebensstunden statt. Kommt es zu einer unzureichenden Aufnahme von Immunglobulinen, entwickelt sich eine Hypogammaglobulinämie (HGG), aus welcher häufig Sekundärerkrankungen resultieren (Crawford et al., 1978). Daher ist eine frühzeitige Erkennung der HGG sowie eine zeitige Therapie von großer Wichtigkeit für den Gesundheitsstatus des Fohlens. Aus diesem Grund ist die Messung der Serum-IgG-Konzentration von neugeborenen Fohlen ein wichtiger Bestandteil der equinen Neonatologie. Für eine ausreichende Versorgung sollte die Serum-IgG-Konzentration nach den ersten 24 Lebensstunden mindestens 8 g/l aufweisen (Koterba et al., 1985; Raidal, 1996). Liegt zu diesem Zeitpunkt eine nicht ausreichende Versorgung und somit eine HGG vor, ist die Therapie der Wahl eine Plasmatransfusion (Christmann, 2021).

Im Rahmen der Dissertation wurde ein semiquantitativer Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Bestimmung von equinem Immunglobulin G im Serum von neonatalen Fohlen entwickelt, um folgende Fragen zu beantworten:

- Welches schnell durchführbare Verfahren ist am besten geeignet, um Immunglobulin G aus dem Serum von Fohlen zu bestimmen?
- Welche Schwellenwerte können für die Diagnose einer HGG durch das Totalprotein und die Gesamtglobuline festgelegt werden?
- Wie verhält sich die Serum-IgG-Konzentration von Fohlen nach Plasmatransfusion?

- Wie hoch ist die benötigte Transfusionsmenge für ein Fohlen mit HGG?

2 Literaturübersicht

2.1 Publikation 1

Immunglobulinkonzentration im equinen Kolostrum und im Blut neugeborener Fohlen sowie klinisch relevante IgG-Bestimmungsmethoden

Maren Sievert, Judith Krohn, Axel Wehrend

eingereicht: 21.06.2019

akzeptiert: 18.08.2019

Bibliografie

DOI <http://doi.org/10.1055/a-1005-0004>

Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2019; 47: 298-308

© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York

ISSN 1434-1220

Beschreibung des Eigenanteils:

Studienplanung: A. Wehrend

Literatursuche und Auswertung: M. Sievert

Manuskripterstellung: M. Sievert

Revision des Manuskriptes: M. Sievert, J. Krohn

Immunglobulinkonzentration im equinen Kolostrum und im Blut neugeborener Fohlen sowie klinisch relevante IgG-Bestimmungsmethoden

Eine Übersicht

Immunoglobulin concentration in equine colostrum and blood of newborn foals as well as clinically relevant IgG evaluation methods

An overview



Autoren

Maren Sievert, Judith Krohn, Axel Wehrend

Institut

Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie der Groß- und Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen

Schlüsselwörter

Fohlen, Immunglobulin G, Kolostrum, Neonatologie

Key words

Foal, immunoglobulin G, colostrum, neonatology

eingereicht 21.06.2019

akzeptiert 18.08.2019

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/a-1005-0004>
 Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere 2019; 47: 298–308
 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York
 ISSN 1434-1220

Korrespondenzadresse

Maren Sievert
 Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie
 der Groß- und Kleintiere
 Justus-Liebig-Universität Gießen
 Frankfurter Straße 106
 35392 Gießen
 maren.sievert@vetmed.uni-giessen.de

ZUSAMMENFASSUNG

Durch den speziellen Aufbau der equinen Plazenta sind Fohlen post natum auf eine adäquate Aufnahme von Kolostrum guter Qualität angewiesen, um die Entwicklung einer passiven Immunität zu sichern. Die Qualität des Kolostrums hängt insbesondere von seinem IgG-Gehalt ab. Dieser lässt sich durch direkte und indirekte Methoden (Dichte und Brechungsindex) ermitteln. Die Dichte des Kolostrums wird durch ein Kolostrometer bestimmt und sollte mindestens 1060 g/l betragen. Zur

Bestimmung der relativen Dichte bzw. des Brechungsindex eignet sich die Refraktometrie. Kolostrum ausreichender Qualität weist einen Brix-Wert von mindestens 20% auf. Die Bestimmung der IgG-Konzentration im Blut des Fohlens kann ebenfalls über direkte und indirekte Verfahren erfolgen. Eine direkte semiquantitative Messmethode ist der SNAP®-Test, wobei Werte von > 800 mg/dl für eine adäquate Versorgung anzeigen. Als alternative direkte Messverfahren können ein auf radialer Immundiffusion basierender Test, der Latexagglutinationstest und die Immunturbimetrie angewendet werden. Zu den indirekten Verfahren zählen der Zinksulfattrübungstest, der Glutaraldehyd-Koagulationstest, die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration, der Globulinkonzentration und der Aktivität der γ -Glutamyltransferase.

ABSTRACT

Due to the special structure of the equine placenta, foals depend on an adequate intake of high-quality colostrum post natum in order to ensure the development of passive immunity. The quality of the colostrum is determined, among other things, by the IgG content. This may be evaluated in the colostrum by direct and indirect methods (density and refractive index). The density of the colostrum is measured by a colostrometer and should amount to at least 1060 g/l. Refractometry is suitable for assessing the relative density or refractive index. Good equine colostrum has a Brix value of at least 23%. The IgG concentration in the blood of the foal may also be determined by direct and indirect methods. The SNAP®-Test is regarded as a direct semi-quantitative measurement method, with values > 800 mg/dl indicating an adequate IgG concentration. Furthermore, the radial immunodiffusion test, the latex agglutination test, and the immunturbimetry are direct methods that may be applied. Indirect methods include the zinc sulphate turbidity test, the glutaraldehyde coagulation test, as well as the measurement of total protein, globulin concentration and γ -glutamyl transferase activity.

Einleitung

Equines Kolostrum hat für neugeborene Fohlen essenzielle Bedeutung. Da diese aufgrund des epitheliochorialen Plazentationstyps des Pferdes hypogammaglobulinärisch geboren werden, ist die Aufnahme von Kolostrum unabdingbar für die Versorgung des neonatalen Organismus mit Antikörpern. Beim neugeborenen Fohlen liegt der Immunglobulin-G-Gehalt des Serums vor einer Kolostrumaufnahme zwischen 2 und 170 mg/dl [48]. Dies reicht quantitativ nicht aus, um einer postnatalen Infektion entgegenzuwirken. Wenn nach der Geburt nicht ausreichend kolostrale Antikörper resorbiert werden, tritt das Problem einer pathologischen Hypogammaglobulinämie in den ersten Lebenstagen auf [50].

Wichtig für eine protektive Versorgung ist neben der Menge und dem Zeitpunkt der Aufnahme vor allem die Qualität des Kolostrums. Zur Bestimmung des IgG-Gehalts von Kolostrum gibt es neben labor diagnostischen Methoden einige Tests, die sich laborunabhängig durchführen lassen. Zu diesen zählen die Bestimmung des spezifischen Gewichts durch Kolostrometrie sowie die Messung des Brechungsindex mit dem Brix-Refraktometer [54].

Es empfiehlt sich, die ausreichende Versorgung mit IgG im Blut des Fohlens 18 Stunden nach erster Tränkeaufnahme zu kontrollieren, um bei einer Hypogammaglobulinämie rechtzeitig Therapiemaßnahmen einzuleiten zu können [20]. Dazu stehen verschiedene direkte und indirekte Verfahren zur Verfügung. Ziel dieser Übersichtsarbeit ist, die verschiedenen Methoden der IgG-Bestimmung im Fohlenblut und Kolostrum mit ihren Vor- und Nachteilen vorzustellen.

Kolostrogenese der Stute

Während der letzten beiden Trächtigkeitswochen bildet sich das Euter der Stute bis zum laktationsfähigen Stadium an. Die Synthese des Kolostrums setzt in dieser Zeit ein [43]. Nach Pearson et al. [46] kommt es in den letzten 2 Gestationswochen zu einer Steigerung der Kolostrumproduktion, wodurch sich die Mamma deutlich vergrößert. Lavoie et al. [33] untersuchten bei 6 pluriparen Warmblutstuten das Kolostrumvolumen zum Zeitpunkt des Partus sowie alle 2 Stunden post partum (p. p.) über einen Zeitraum von 16–20 Stunden. Das durchschnittliche Kolostrumvolumen betrug 292 ± 26 ml/Stunde (Spannweite 202–389 ml/Stunde). Die durchschnittliche Gesamtmenge lag bei $5,1 \pm 0,5$ l mit Extremwerten von 3,2 und 7,0 l. Das Kolostrumvolumen von primiparen Stuten in den ersten 3 Stunden p. p. ist signifikant geringer (527 ± 227 ml) als das von pluriparen Stuten (1019 ± 323 ml) [62]. Zwischen der linken und rechten Euterhälfte wurden keine signifikanten Unterschiede im Kolostrumvolumen festgestellt [62].

Immunglobulingehalt des Kolostrums

Immunglobulinklassen

Das Kolostrum besteht hauptsächlich aus Proteinen und Sekreten der Milchdrüse und unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von der reifen Milch. Bei den Proteinen handelt es sich vor allem um Immunglobuline [43], von denen IgG die größte Fraktion bildet [56]. Der IgG-Gehalt des Kolostrums erreicht den 2- bis 8-fachen Wert der IgG-Konzentration im Serum der Stuten [20], doch korreliert eine hohe IgG-Konzentration im Blut nicht mit einer hohen IgG-Kon-

zentration im Kolostrum [30][62][66]. Bei eutergesunden Stuten ließ sich hinsichtlich der IgG-Konzentration kein Unterschied zwischen dem Kolostrum der beiden Euterhälften nachweisen [62].

Die IgG-Moleküle werden von Plasmazellen sezerniert und lassen sich bei Pferden in 7 Isotypen mit unterschiedlichen immunologischen Funktionen einteilen [65]. Im Kolostrum sind vor allem IgG 4 und IgG 7 angereichert, die die wichtigste Rolle bei der Infektabwehr spielen. Des Weiteren finden sich im Kolostrum IgA, IgM und IgE. Die mittlere Konzentration von IgA beträgt 1000 mg/dl, die von IgM liegt zwischen 35 mg/dl und 123 mg/dl [32]. IgE kommt nur in äußerst geringen Konzentrationen im Kolostrum vor [32].

Zeitlicher Verlauf der Immunglobulinkonzentrationen

Direkt nach der Abfohlung liegt die IgG-Konzentration im Kolostrum zwischen 4000 und 17000 mg/dl, wobei Extremwerte von 350 bzw. 30000 mg/dl nachgewiesen wurden [44][46][62][66]. Sitzenstock et al. [58] ermittelten beispielsweise mit einem modifizierten Refraktometer zur Zuckermessung bei 75 Zuchtstuten direkt nach dem Partus eine mittlere IgG-Konzentration von 6200 mg/dl (Minimum 6100 mg/dl, Maximum 13500 mg/dl). Innerhalb der ersten 8 Stunden sinkt die IgG-Konzentration auf ca. die Hälfte bis ein Drittel und liegt nach 12–15 Stunden noch bei 10–20% der Ausgangswerte. Nach Warko und Bostedt [66], die Kolostrumproben von 16 Stuten in einem Zeitraum bis 96 Stunden p. p. untersuchten, sinkt die IgG-Konzentration in diesem Zeitraum sogar auf 4,2% der Ausgangswerte. Auch Warko und Bostedt [66] sowie Luft [36] stellten einen signifikanten Abfall der IgG-Konzentration fest, und zwar 6 bzw. 9–12 Stunden p. p.

Koke et al. [31] untersuchten bei 5 Quarter-Horse-Stuten ab dem 30. Tag vor dem errechneten Geburtstermin bis 24 Stunden p. p. mittels ELISA die Konzentrationen von IgG, IgM und IgA in Milchproben aus dem Euter. Ab dem 21. Tag ante partum (a. p.) waren alle 3 Immunglobulinfaktionen nachweisbar, wobei die höchsten Konzentrationen 1 Stunde vor der Geburt ermittelt wurden. IgG stellte den größten Anteil dar ($301,3 \pm 116,7$ bis $19244,1 \pm 27443$ mg/dl). Die Konzentration fiel innerhalb der ersten 24 Stunden p. p. stark ab. Die IgA-Konzentration zeigte einen starken Anstieg am letzten Tag a. p., der sich weiter fortsetzte, sodass IgA 2 Wochen p. p. die vorherrschende Immunglobulinfaktion repräsentierte. Bei der IgM-Konzentration waren 5 Tage a. p. ein starker Anstieg sowie ein deutlicher Abfall innerhalb von 24 Stunden p. p. zu verzeichnen.

Einflussfaktoren auf die IgG-Konzentration

Parität

Einigen Studien zufolge differiert die mittlere initiale IgG-Konzentration bei primiparen und pluriparen Stuten nicht signifikant [36][55][66]. Venner et al. [62] kamen bei der Untersuchung von 360 Milchproben von 36 Warmblutstuten mittels ELISA, Kolostrometrie und Refraktometrie zu dem Ergebnis, dass zum Zeitpunkt des Partus die IgG-Konzentration bei primiparen Stuten im Alter von 3–4 Jahren signifikant höher ist ($67,7 \pm 18,4$ mg/ml) als bei Stuten, die mindestens 8 Jahre alt sind zum 4. Mal abfohlen ($50,7 \pm 17,6$ mg/ml). Unter Berücksichtigung des Kolostrumvolumens in den ersten 3 Stunden p. p. war jedoch die Gesamtmenge an IgG bei den pluriparen Stuten mit $41,2 \pm 19,9$ g signifikant höher als bei den primiparen Stuten mit $25,7 \pm 8,2$ g.

Auch in Hinblick auf Geschwindigkeit des Abfalls der IgG-Konzentration im Kolostrum zeigten sich Unterschiede zwischen primipar und pluripar Stuten. Die mittlere IgG-Konzentration im Kolostrum von primipar Stuten fällt innerhalb der ersten 6 Stunden p. p. um ca. 60% ab; bei pluripar Stuten ist ein signifikanter Abfall bereits nach 1,5 Stunden zu verzeichnen [38].

Alter

Ein Einfluss des Alters bei erster Abfohlung auf die IgG-Konzentration im Kolostrum beschrieben Hemberg et al. [21], die 50 Stuten untersuchten. Dabei lag die IgG-Konzentration im Kolostrum bei Stuten, die im Alter von < 9 Jahren erstmals abfohlten, signifikant höher als bei Maidenstuten mit erstem Partus in einem höheren Alter. Dies wurde durch eine Untersuchung von LeBlanc et al. [35] an 293 Stuten bestätigt: Sie ermittelten bei 55% der Fohlen von Stuten, die älter als 15 Jahren waren, eine IgG-Konzentration von < 800 mg/dl im Blut, während nur 29% der Fohlen von jüngeren Stuten entsprechend niedrige Werte aufwiesen.

Gestationsdauer

Die Gestationsdauer wirkt sich ebenfalls auf den Immunglobulin-gehalt des Kolostrums aus. Bei einer Trächtigkeitdauer von 335–340 Tagen ermittelte Kähn [32] das geringste Risiko für einen fehlerhaften Immunglobulintransfer.

Rasse

Perryman und McGuire [48] sowie Chavatte et al. [10] stellten fest, dass die Rasse der Stuten keinen signifikanten Einfluss auf die Immunglobulin-Konzentration im Kolostrum hat. Nach Bellinghausen [4] kommt eine Unterversorgung mit Immunglobulinen bei robusten Pferderassen, wie beispielsweise Isländern, seltener vor. So lag die mit dem CITE-IgG-Fohlentest (IDEXX) bestimmte IgG-Konzentration nur bei einem der 20 untersuchten Isländerfohlen unter 800 mg/dl. Ebenso stuften Chevalier-Clement und Genin [11] die Qualität des Kolostrums bei Kaltblutpferden als hochwertiger ein. Pearson et al. [46] wiesen hinsichtlich des IgG-Gehaltes des Kolostrums (Messung mittels radialer Immundiffusion) Rasseunterschiede bei hoch im Blut stehenden Rassen nach. Die IgG-Konzentration des Kolostrums lag bei den untersuchten 22 Englischen Vollblutstuten mit 46,08 mg/ml signifikant niedriger als bei den 14 Arabischen Vollblutstuten mit 96,91 mg/ml.

Jahreszeit der Abfohlung

Verschiedenen Studien zufolge hat die Jahreszeit, in der das Fohlen geboren wird, keinen Einfluss auf die IgG-Konzentration [18][37]. Clabough [12] untersuchte 361 Stuten und deren Fohlen im Hinblick auf Faktoren, die zu einem fehlerhaften passiven Immunglobulintransfer führen (definiert als IgG-Konzentration < 400 mg/ml). Die Bestimmung der Immunglobulin-Konzentration im Serum der Fohlen erfolgte mit dem Glutaraldehyd-Koagulationstest. Fohlen, die früh in der Zuchtseason geboren wurden, zeigten eine stärkere Gefährdung als Fohlen aus dem späten Frühjahr. Die Studie evaluierte außerdem Parameter der Stute (z. B. Plazentagewicht, Nachgeburtverhaltung) im Hinblick auf ihre Korrelation zur Kolostrumqualität, wobei keine signifikanten Zusammenhänge feststellbar waren.

Immunisierung

Durch aktive Immunisierung der graviden Stute kann die Immunglobulin-Konzentration im Kolostrum gesteigert werden, da so vermehrt Immunglobuline im Serum der Stute gebildet werden und es zu einer verstärkten Anreicherung im Kolostrum kommt [47]. Es ist sinnvoll, die Stute schon 14 Tage vor Geburtstermin an den Ort zu verbringen, an dem die Abfohlung stattfinden soll, um den Stress durch die neue Umgebung unmittelbar vor der Geburt so gering wie möglich zu halten. Eine stärkere Stressbelastung kann zu einer verminderten Qualität des Kolostrums führen [29]. Des Weiteren bildet die Stute so Antikörper gegen die Mikroorganismen der Umgebung, in der die Geburt stattfindet [29].

Vitamin-E-Supplementierung

Bondo und Jensen [6] untersuchten den Einfluss einer Vitamin-E-Supplementierung bei Warmblutstuten im Zeitraum von 3 Wochen vor der erwarteten Abfohlung bis zu 2 Tage p. p.. Die Probanden der Testgruppe (n = 17) erhielten täglich Vitamin E oral in Form von 2500 IU RRR- α -Tocopherol, die Kontrolltiere (n = 17) blieben unbehandelt. Die Messung mittels ELISA ergab in der Testgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe an den Tagen 2 und 3 p. p. eine signifikant höhere IgG-Konzentration im Kolostrum (1,03 bzw. 0,73 mg/ml vs. 0,79 bzw. 0,56 mg/ml). Gleiches galt für die IgM-Konzentration (0,19 bzw. 0,17 mg/ml vs. 0,13 bzw. 0,11 mg/ml). Bei den Fohlen resultierte die Vitamin-E-Supplementierung der Stuten ebenfalls in einer signifikant höheren IgM-Konzentration an Tag 3 (0,50 mg/ml vs. 0,32 mg/ml).

Haltungsförm

Erhard et al. [18] untersuchten Kolostrum- und Blutproben von 139 Stuten diverser Rassen sowie Blutproben ihrer Fohlen bei verschiedenen Haltungsförm mittels ELISA im Zeitraum unmittelbar p. p. bis 6 Wochen p. p.. Zwischen den Kolostrumproben sowie den Blutproben der Fohlen ließen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der IgG-Konzentration nachweisen. Somit wirkt sich die Haltungsförm nicht signifikant auf die IgG-Konzentration im Kolostrum der Stute aus. Dies lässt sich auf die IgG-Konzentration im Blut der Fohlen übertragen, wobei dabei weitere Einflüsse eine Rolle spielen.

Untersuchte Einflussfaktoren auf die Kolostrumqualität sind in ► Tab. 1 zusammengefasst. Generell ist davon auszugehen, dass große individuelle Unterschiede zwischen einzelnen Stuten vorliegen, die die Faktoren wie Alter, Parität und Saison überlagern.

Immunglobulinstatus neugeborener Fohlen Resorption kolostraler Immunglobuline

Die Aufnahme der Immunglobuline aus dem Kolostrum erfolgt im Dünndarm des equinen Neonaten durch spezialisierte Epithelzellen über Pinozytose. Der an diesen Epithelzellen exprimierte neonatale Fc-Rezeptor (FcRn) vermittelt und reguliert die Resorption [17]. Innerhalb von 38 Stunden post natum (p. n.) werden diese Epithelzellen durch mature Darmzellen ersetzt, die keine Passage von Makromolekülen mehr zulassen [28]. Dieser Absorptionsstillstand wird als *closure* bezeichnet und ist beim Pferd bisher wenig erforscht. In experimentellen Untersuchungen wurden in den ersten 3 Stunden p. n. 22% der über das Futter zugeführten Makromole-

► **Tab. 1** Untersuchte Einflussfaktoren auf die IgG-Konzentration des equinen Kolostrums.

► **Table 1** Evaluated factors influencing the IgG concentration of equine colostrum.

Einflussfaktor	Auswirkung	Quellen
Euterhälfte	keine	[62]
Gestationsdauer	Risiko für Hypogammaglobulinämie bei 335–340 Tagen am geringsten	[32]
Parität	keine	[36][55][60]
	höhere mittlere Konzentration bei primiparen Stuten bei geringerem Kolostrumvolumen in den ersten 3 h p.p.	[62]
Alter der Stute bei 1. Abfohlung	geringerer Gehalt bei höherem Alter	[21][35]
Jahreszeit der Abfohlung	keine	[18][37]
	niedrigere Werte bei frühzeitiger Abfohlung	[12]
Rasse	keine	[10][48]
	bessere Qualität bei Robustpferden	[4][11]
Haltungsfarm	keine	[18]
Immunsierung der graviden Stute	Steigerung	[47]
Vitamin-E-Supplementierung der Stute	Steigerung	[6]
IgG-Konzentration im Blutserum der Stute	keine	[30][62][66]

küle resorbiert, 7–14 Stunden p. n. noch 10% und 20 Stunden p. n. weniger als 1% [26]. Berücksichtigt man dabei die zusätzliche Resorption in die extravasalen Räume, liegt die tatsächliche Resorption zwar doppelt so hoch, doch wird die zeitlich begrenzte enterale Aufnahme von Immunglobulinen deutlich. Die Aufnahme kolostraler Immunglobuline über den Darm in den ersten Lebensstunden ist daher essenziell für das neugeborene Fohlen.

Die Zeitspanne der Resorption nach Kolostrumaufnahme beträgt 6 Stunden, sodass sich IgG im Blut des Fohlens nach dieser Zeit messen lässt. Ab der 12. Stunde p. n. sind Werte um 800 mg/dl optimal und Maximalwerte können zwischen der 12. und 18. Stunde nach erster Aufnahme ermittelt werden [28]. Erhard et al. [18] stellten bei 139 mittels EISA untersuchten Fohlenblutproben einen Anstieg der mittleren IgG-Konzentration im Serum von 30 mg/dl vor der ersten Kolostrumaufnahme auf 960 mg/dl 5–8 Stunden p. n. fest. Das Maximum der mittleren IgG-Konzentration von 1570 mg/dl erreichten die Fohlen 13–16 Stunden p. n. Ähnliche Resultate ergaben sich in einer früheren Studie [66].

Bildung eigener Immunglobuline

Fohlen nehmen in den ersten 12–15 Stunden nach der Geburt im Durchschnitt 2–3 l Kolostrum auf und erreichen so die optimale Immunglobulinkonzentration für eine effektive Immunabwehr, vorausgesetzt es handelt sich um Kolostrum von guter Qualität [32]. Am 2. Tag nach der Kolostrumaufnahme erreicht ihr Immunglobulinspiegel im Blut den eines adulten Pferdes [32]. Anschließend nimmt die durch die Kolostrumaufnahme erlangte passive Immunität kontinuierlich ab und das Fohlen synthetisiert eigene Immunglobuline [52]. Die Synthese der Antikörper wird zuvor durch die maternalen Immunglobuline unterdrückt [24]. Im Zeitraum des 1.–2. Monats p. n. fällt die Konzentration der kolostralen Immunglobuline auf den niedrigsten Level [19]. Nach einem halben Jahr sind die kolostralen Immunglobuline durch die Verstoffwechslung (die biologische Halbwertszeit von Immunglobulinen be-

trägt 20–30 Tage), den Verdünnungseffekt durch das Wachstum des Fohlens sowie durch Verbrauch nicht mehr im Blut nachweisbar [32].

Die autogene Produktion der Immunglobuline durch das Fohlen erfolgt bei den einzelnen Immunglobulinklassen zu verschiedenen Zeitpunkten. Während die Eigensynthese von IgM in nennenswerten Mengen bereits in utero stattfindet, setzt die Synthese von IgG und IgA im Verlauf des 1. Lebensmonats ein. Der Zeitraum, in dem sich passive und aktive Immunität überlappen, liegt somit zwischen der 2. Lebenswoche und dem 4. Lebensmonat. Die im Verhältnis niedrigsten Werte der Immunglobulinkonzentration im Blut der Fohlen können im 2. Monat p. n. festgestellt werden, da zu diesem Zeitpunkt die negative Korrelation zwischen passiver und aktiver Immunität am größten ist [27][40][52]. Dieser Zeitpunkt korreliert mit einem erhöhten Auftreten von bakteriellen Infektionen des Respirationstrakts [23]. Gesunde Fohlen erreichen zwischen dem 3. und 8. Lebensmonat einen Immunstatus, der mit dem adulten Pferde vergleichbar ist [27][52].

Klassifizierung der Immunglobulinversorgung

Die Versorgung mit Immunglobulinen kann anhand der im Blut des Fohlens gemessenen IgG-Konzentration klassifiziert werden. McGuire et al. [41] erstellen hierzu folgende Einteilung: Eine IgG-Konzentration > 800 mg/dl kennzeichnet eine optimale Versorgung und verifiziert einen physiologischen Immunglobulintransfer. Konzentrationen zwischen 400 und 800 mg/dl charakterisieren eine suboptimale Versorgung. Ein partieller fehlerhafter passiver Transfer (FPPT) ist definiert als IgG-Konzentration zwischen 200 und 400 mg/dl und ein vollständiger fehlerhafter passiver Transfer (FPT) als IgG-Konzentration < 200 mg/dl. Diese Definition der Immunglobulinversorgung wird zum jetzigen Zeitpunkt vielfach verwendet, unterscheidet sich jedoch von den Angaben anderer Autoren [44][59].

Nachweisverfahren zur Bestimmung des Immunglobulingehalts im Blut der Fohlen

Um die Konzentration von Immunglobulinen im Blut von Fohlen zu bestimmen, können direkte und indirekte Verfahren angewendet werden. Zu den direkten Verfahren zählen unter anderem der SNAP® Foal IgG Test (IDEXX Laboratories), die radiale Immundiffusion, der Latexagglutinationstest sowie die Immunturbidimetrie. Bei den indirekten Verfahren sind der Zinksulfattrübungstest, der Glutaraldehyd-Koagulationstest, die Gesamtproteinmessung, die Globulinbestimmung und die Aktivitätsmessung der γ -Glutamyltransferase (GGT) zu nennen [6].

Direkte Verfahren zur IgG-Bestimmung

SNAP® Foal IgG Test

Dieser Schnelltest beruht auf der ELISA-Technologie. Die Messbreite wird in 3 Kategorien eingeteilt: < 400 mg/dl, 400–800 mg/dl und > 800 mg/dl. Dieser Test ermöglicht es, die Immunglobulinversorgung des Fohlens innerhalb von 10 Minuten zu überprüfen. Er besitzt eine hohe Genauigkeit in den niedrigen (< 400 mg/dl) und hohen (> 800 mg/dl) Bereichen [49]. Unterstab [61] untersuchte Blutproben von 53 Fohlen mit dem SNAP®-Test und verglich die Resultate mit denen eines laborgebundenen ELISAs. Im niedrigen Bereich zeigte sich eine Übereinstimmung von 100 % und im Bereich einer hohen IgG-Konzentration (> 800 mg/dl) eine Übereinstimmung von 98 %. Insgesamt lag die Übereinstimmung der beiden Tests bei 96 %. Bei Definition einer Hypogammaglobulinämie als IgG-Konzentration \leq 800 mg/dl 18 Stunden nach erster Tränkeaufnahme zeigte der SNAP®-Test eine Sensitivität von 85,71 % und eine Spezifität von 100 %. Letztere ist allerdings zu relativieren, da die Anzahl der Fohlen mit einer Hypogammaglobulinämie in der Studie gering war.

Radiale Immundiffusion (RID)

Bei dem auf diesem Prinzip basierenden Test wird durch eine immunchemische Methode eine Antigen-Antikörper-Reaktion und somit IgG nachgewiesen [32]. Das Verfahren erfordert eine Inkubationszeit von ca. 24 Stunden [14]. Die Präzision dieser Methode wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Becht und Semrad [3] beschreiben die RID als effizienteste Methode zur Bestimmung der IgG-Konzentration im Blut der Fohlen. Brown [8] hingegen kritisiert, dass die Ergebnisse dieses Verfahrens nicht miteinander vergleichbar sind, da sie in den Tests nicht standardisiert und objektiv ermittelt werden. Auch Kähn [32] sieht die verfahrensbedingten Unterschiede als bedenklich an.

Latexagglutinationstest

Bei diesem Test, der sich innerhalb von 15 Minuten durchführen lässt, wird IgG an Latexpartikel gebunden. Der Test ermöglicht die Beurteilung der IgG-Konzentration in Bereichen von < 200 mg/dl, 200–400 mg/dl und > 400 mg/dl [13][32]. Baird et al. [2] untersuchten Blutproben von 45 Fohlen und vergleichend mit dem Latexagglutinationstest und einem einfachen RID-Test, wobei sich zwischen den beiden Testverfahren eine Übereinstimmung von 88 % ergab.

Immunturbidimetrie

Die Immunturbidimetrie beruht auf einer Komplexbildung von Antigenen und Antikörpern [16]. McCue [39] verwendete diese Methode zur Bestimmung der IgG-Konzentration im Plasma von Fohlen mit Einsatz eines RID-Tests als Referenzmethode ($r = -0,95$). Die Spezifität betrug bei einer IgG-Konzentration von 800 mg/dl 70,5 % und bei einer IgG-Konzentration von 400 mg/dl 99,1 % bei einer Sensitivität von jeweils > 90 %.

Indirekte Verfahren zur IgG-Bestimmung

Zinksulfattrübungstest

Bei diesem Verfahren wird das Testserum mit einer Zinklösung vermischt. Der Test ist schnell durchführbar und besitzt eine gute Genauigkeit [29]. Nach Crawford und Perryman [14] lassen sich die Testergebnisse mit denen des RID-Tests vergleichen. Auch Morris et al. [44] stellten bei vergleichendem Einsatz von Zinksulfattrübungstest und RID-Test zur Messung der IgG-Konzentration im Blut von Fohlen eine signifikante Übereinstimmung fest ($p < 0,001$). Rumbaugh et al. [53] ermittelten bei einem Vergleich dieser beiden Verfahren bei 84 Fohlen einen signifikanten Korrelationskoeffizienten von $r = 0,88$. Als großer Vorteil des Zinksulfattrübungstests gilt, dass er in maximal 60 Minuten durchführbar ist und bei hohen IgG-Konzentrationen deutlich schneller Ergebnisse liefert.

Glutaraldehyd-Koagulationstest

Dieser Test basiert auf einer Polymerisierung der Gammaglobuline durch Glutaraldehyd, da die Aldehyde und freien Aminogruppen miteinander vernetzt werden. Anhand der Zeitdauer der Reaktion kann auf eine hohe oder niedrige IgG-Konzentration in der Probe geschlossen werden [5].

Messung der Gesamtproteinkonzentration

Hierbei sind 2 Methoden zu unterscheiden: a) die alleinige Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration als Maß für die IgG-Konzentration; b) Messung der Gesamtprotein- sowie Albuminkonzentration und Bildung der Differenz zur Ermittlung des Globulinanteils, der zum größten Teil von IgG bestimmt wird.

Die alleinige Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration, wie sie bei bovinen Neonaten genutzt wird, erhält in der Literatur kontroverse Bewertungen. Eine Korrelation besteht im Fall einer Hypogammaglobulinämie (hier definiert als IgG-Konzentration < 800 mg/dl), bei der die Gesamtproteinkonzentration signifikant niedrigere Werte zeigt [60]. Tyler-McCowan et al. [59] untersuchten Blutproben von 88 Fohlen mittels Refraktometer und kamen zu dem Ergebnis, dass Fohlen mit einem Gesamteiweißgehalt von < 47 g/l 18 Stunden p. n. keine ausreichende Immunglobulinversorgung aufweisen können. Die Untersucher hatten zuvor signifikante Unterschiede ($p < 0,01$) zwischen einer ausreichenden oder nicht ausreichenden Immunglobulinversorgung und der Gesamtproteinkonzentration festgestellt. Überschreitet der Gesamtproteingehalt 12 Stunden p. n. 60 g/l, ist laut Roscher [51] eine IgG-Konzentration von < 800 mg/dl als sehr unwahrscheinlich anzusehen, liegt der Gehalt bei < 45 g/l ist eine IgG-Konzentration von < 400 mg/dl wahrscheinlich [51]. Unterstab [61] bestimmte bei Fohlen mindestens 12 Stunden p. n. die Gesamtproteinkonzentration mittels Fotometer und Refraktometer. Bei einem fotometrisch gemessenen Gesamtproteingehalt von 46 g/l kann ihrer

Studie zufolge mit einer Sensitivität von 86% und einer Spezifität von 98% auf einen IgG-Gehalt von ≥ 800 mg/dl geschlossen werden. Bei der Messung mittels Refraktometer kann bei einem Wert von 49 g/l mit einer Sensitivität von 86% und einer Spezifität von 96% von einem IgG-Gehalt von ≥ 800 mg/dl ausgegangen werden.

Das Ergebnis der Gesamtproteinmessung kann allerdings durch Erkrankungen der Fohlen mit Auswirkungen auf die Gesamtproteinkonzentration im Blut verfälscht werden [51]. Rumbaugh et al. [53] bezeichnen diese Methode als unzuverlässig und als allein nicht nutzbar, da in ihrer Studie die Gesamtproteingehalte bei Fohlen, die einen adäquaten passiven Immunglobulintransfer zeigten, nach dem Saugakt sanken. Als Goldstandard zur Messung der IgG-Konzentration verwendeten sie den RID-Test. Metzger et al. [42] bestätigen diese Aussage durch eine Studie mit 67 Fohlen, in der sie sowohl die Messung der Gesamtproteinkonzentration als auch die Bestimmung der Globulinkonzentration mit dem RID-Test verglichen. Anders als Rumbaugh et al. [53] erachteten sie die Bestimmung des Gesamtproteingehalts als zusätzlichen Test jedoch für sinnvoll. Ihren Ergebnissen zufolge macht eine Globulinkonzentration von ≥ 24 g/l eine Immunglobulinkonzentration von < 800 mg/dl unwahrscheinlich (Sensitivität 94%, Spezifität 44%). Hurcombe et al. [25] untersuchten 2 Gruppen mit insgesamt 76 Fohlen mittels Immunturbidimetrie auf die Korrelation zwischen der IgG-Konzentration und Gesamtprotein, Gesamtglobulin und Albumin im Blut und stellten zwischen allen Methoden und der IgG-Konzentration signifikante Korrelationen fest. Weiterhin ergab sich in ihrer Studie eine lineare Beziehung zwischen der Globulin- und der IgG-Konzentration im Serum.

Bestimmung der γ -Glutamyltransferase-Aktivität

Die Aktivitätsmessung der γ -Glutamyltransferase (GGT) wird beim bovinen Neonaten zur Bestimmung der IgG-Konzentrationen verwendet und ist für diese Tierart evaluiert [7]. Bisher beschäftigten sich nur wenige Untersucher mit der Bestimmung der IgG-Konzentration durch die GGT-Aktivität beim Fohlen, doch wurden Referenzwerte ermittelt. Diese liegen vor der Kolostrumaufnahme bei 14,3–33,6 IU/l und nach Kolostrumaufnahme zum Zeitpunkt zwischen 15 und 36 Stunden p. n. bei 20,3–42,9 IU/l [7][45][63]. Unterstab [61] ermittelte die GGT-Aktivität bei Fohlen vor der ersten Tränkeaufnahme und 12 Stunden p. n. mit Werten von 9,82 IU/l bzw. 16,29 IU/l. Die Aktivität der GGT stieg nicht gleichmäßig, sodass einige Fohlen zum 2. Messzeitpunkt niedrigere Werte aufwiesen als bei der 1. Messung. Für die Korrelation zwischen Messung 1 und 2 ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,18$ und der Zusammenhang erwies sich als nicht statistisch signifikant ($p = 0,23$). Daraus schloss Unterstab [61], dass diese Methode nicht geeignet ist, um die IgG-Konzentration im Blut der Fohlen zu überprüfen.

Qualitätsbeurteilung des Kolostrums

Eine erste Beurteilung kann durch die visuelle Überprüfung von Farbe, Konsistenz und Beimengungen einer Kolostrumprobe erfolgen. Die Bestimmung des spezifischen Gewichts, die Messung der relativen Dichte und die Viskositätsmessung sind Methoden für eine objektive Qualitätsbeurteilung des Kolostrums [9][34][62][64].



► **Abb. 1** Equines Kolostrum unterschiedlicher Farben. Zu beachten ist, dass sich nicht in allen Studien ein Zusammenhang zwischen IgG-Gehalt und Farbe des Kolostrums nachweisen ließ, sodass die Farbe keinen guten Qualitätsparameter darstellt [54]. Quelle: © M. Slevert.

► **Fig. 1** Equine colostrum of different colors. It should be noted that not all studies demonstrated a correlation between colostrum IgG content and its color, therefore, the color is not considered to be a high-quality parameter for evaluation [54]. Source: © M. Slevert.

► **Tab. 2** Beurteilung der Qualität von equinem Kolostrum bei Anwendung eines Brix-Refraktometers und Immunturbidimetrie (nach Daten aus Cash [9]).

► **Table 2** Evaluation of equine colostrum quality using a Brix refractometer and immunoturbidimetry (according to data from Cash [9]).

Brix-Wert (%)	IgG-Konzentration (mg/dl)	Kolostrumqualität
< 10–15	100–2800	schlecht
15–20	2800–5000	grenzwertig
20–30	5000–8000	ausreichend
> 30	> 8000	sehr gut

Farbe

Nach Chavatte et al. [10] lassen physikalische Eigenschaften wie die Farbe auf die IgG-Konzentration schließen. In dieser Studie ordnete ein Untersucher die Kolostrumfarbe (► **Abb. 1**) subjektiv in die Kategorien Weiß oder Gelb ein. Anschließend fand eine Messung der IgG-Konzentration mittels RID-Test statt. Kolostrum der Farbkategorie Gelb wies eine signifikant höhere IgG-Konzentration auf ($p < 0,05$). Dagegen ließ sich in der Studie von Pearson et al. [46], in der ebenfalls ein Untersucher die Kolostrumfarbe beurteilte, kein signifikanter Zusammenhang zwischen Farbe und IgG-Konzentration des Kolostrums feststellen.

► **Tab. 3** Vergleich der biophysikalischen Eigenschaften zur Einschätzung der Kolostrumqualität der Stute mit Angabe von Cut-off-Werten und Korrelation zum IgG-Gehalt [54].

► **Table 3** Comparison of biophysical properties to estimate the colostrum quality of the mare with cut-off values and correlation to IgG content [54].

Biophysikalische Eigenschaft	Messinstrument	Cut-off-Wert	Korrelation zum IgG-Gehalt
Dichte/spezifisches Gewicht	Aräometer	1060 g/l	0,8–0,9
relative Dichte/Brechungsindex	optisches Refraktometer	23 % Brix	0,7–0,94
Viskosität	kein validiertes Verfahren	–	–

Spezifisches Gewicht

Zwischen dem spezifischen Gewicht und damit der Dichte des Kolostrums und der Immunglobulinkonzentration besteht nach der Studie von Leblanc [34] eine enge Korrelation ($r = 0,90$). Der Grenzwert für Kolostrum guter Qualität wird mit > 1060 g/l angegeben [34]. Waelchli et al. [64], Dascano et al. [15] sowie Venner et al. [62], die 360 Kolostrumproben von Stuten mittels ELISA untersuchten, verzeichneten ähnliche Resultate mit einer Korrelation von $r = 0,97$, $r = 0,72$ bzw. $r = 0,88$. Die Messung ist einfach und schnell durchführbar. Nach Kähn [32] weist Kolostrum mit einem spezifischen Gewicht von 1090 g/l eine IgG-Konzentration > 7000 mg/dl auf und kann als von optimaler Qualität beurteilt werden. Als von guter Qualität stuft er das Kolostrum ab einem spezifischen Gewicht von 1060 g/l und einer IgG-Konzentration von 3000 mg/dl ein. Befinden sich die Werte darunter, handelt es sich um Kolostrum minderwertiger Qualität [32]. Auch Aurich et al. [1] sehen eine Abschätzung des IgG-Gehalts des Kolostrums vor der ersten Tränkeaufnahme des Fohlens durch die Dichtemessung als sinnvoll an.

Relative Dichte

Die relative Dichte wird über den Brechungsindex des Kolostrums bestimmt, wobei sich als Maßeinheit die Einheit Grad Brix etabliert hat. Verschiedene Untersucher ermittelten eine gute Korrelation zwischen relativer Dichte und der IgG-Konzentration mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,93$ [62] bzw. $r = 0,94$ [9], sodass sich die Bestimmung der relativen Dichte mittels Brix-Refraktometer zur Beurteilung der Kolostrumqualität eignet. Die Anwendung des Refraktometers gilt als schnelle und günstige Methode, für die nur wenig Probenmaterial benötigt wird. Cash [9] untersuchte 66 Kolostrumproben von 58 Stuten mittels Immunturbidimetrie und Brix-Refraktometer. Kolostrum mit einer nicht ausreichenden IgG-Konzentration zeigte einen Brix-Wert von $< 15\%$, Kolostrum von sehr guter Qualität hatte einen Brix-Wert von $> 30\%$. Eine sehr enge Korrelation zwischen den beiden Verfahren bestand vor allem bei Brix-Werten im Bereich von 0–50 % und einer Messung im Zeitraum von 12–48 Stunden p. p. (► **Tab. 2**).

Viskosität

Die Viskosität ist ein Maß für die Fließfähigkeit eines Stoffes bzw. einer Flüssigkeit. In praxi wird die Viskosität schon lange als Parameter zur Beurteilung der Kolostrumqualität verwendet, da vermutet wird, dass ein hoher Immunglobulingehalt mit einer hohen Viskosität einhergeht. Chavatte et al. [10] untersuchten Kolostrumproben von 39 Stuten und ordneten diese den Kategorien dickflüssig und

wässrig zu. Anhand dieser optischen Bewertung durch einen Untersucher konnten sie keine Korrelation zwischen der Viskosität und dem Immunglobulingehalt im Kolostrum feststellen. Waelchli et al. [64] untersuchten das Kolostrum von 27 Stuten 24 Stunden p. p. und berücksichtigten neben der Viskosität weitere Parameter wie Gesamtproteinkonzentration, spezifisches Gewicht und optischen Brechungsindex (► **Tab. 3**). Die IgG-Konzentration wurde mittels Latexagglutinationstest bestimmt und die Resultate mit den Ergebnissen zur Viskositätsbeurteilung verglichen. Für alle erhobenen Parameter konnte eine direkte Korrelation mit der IgG-Konzentration festgestellt werden. Die Autoren raten jedoch nicht zur Beurteilung der Kolostrumqualität anhand der Viskosität, da die Bestimmung des spezifischen Gewichts oder der kommerziell erhältliche Latexagglutinationstest deutlich einfacher durchführbar ist [64].

Immunturbidimetrie

Auch für dieses Verfahren zur Bestimmung der IgG-Konzentration im Kolostrum ist ein Test kommerziell erhältlich. Eine Arbeitsgruppe aus den Niederlanden [57] untersuchte Kolostrumproben von 43 Stuten mit einem kommerziell erhältlichen turbidimetrischen Immunoassay und wählten als Referenzmethode den RID-Test. Sie stellten fest, dass sich der verwendete Test aufgrund zu hoher Messergebnisse nicht eignete. Der Korrelationskoeffizient zwischen diesem Test und dem RID-Test betrug $r = 0,43$.

FAZIT FÜR DIE PRAXIS

Kolostrum besitzt für equine Neonaten eine essenzielle Bedeutung, da die passive Immunität nur durch qualitativ hochwertiges Kolostrum gesichert werden kann. Als Parameter für die Beurteilung der Kolostrumqualität eignen sich die biophysikalischen Eigenschaften Dichte und Brechungsindex, die sich mit kommerziell erhältlichen Messgeräten bestimmen lassen. Die Bestimmung der IgG-Konzentration im Blut von Fohlens kann durch direkte und indirekte Methoden erfolgen. Das einzige laborunabhängige direkte Verfahren ist derzeit der kommerziell erhältliche SNAP®-Test.

Interessenkonflikt

Die Autoren bestätigen, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Literatur

- [1] Aurich J. Erkrankungen der Milchdrüse. In: Aurich C, Aurich J, Bollwein H, Brückner S, Burger D, Hrsg. Reproduktionsmedizin beim Pferd. 2. Aufl. Stuttgart: Parey; 2008: 225–233
- [2] Baird A, Pugh D, Rupp G et al. Detection of immunoglobulin G in the neonate. *Equine Vet Sci* 1987; 7 (3): 124–129
- [3] Becht J, Semrad S. Hematology, blood typing, and immunology of the neonatal foal. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1985; 1 (1): 91–110
- [4] Bellinghausen W. Die Immunoglobulinsituation bei Robustpferden. *Prakt Tierarz* 1989; 70: 22–25
- [5] Beeton S, Hilbert BJ, Mills JN. The use of the glutaraldehyde coagulation test for detection of hypogammaglobulinemia in neonatal foals. *Austr Vet J* 1983; 62 (8): 279–281
- [6] Bondo T, Jensen SK. Administration of RRR- α -tocopherol to pregnant mares stimulates maternal IgG and IgM production in colostrum and enhances vitamin E and IgM status in foals. *J Anim Physiol A Anim Nutr* 2011; 95: 214–222
- [7] Bostedt H. Vergleichende Untersuchung über die Entwicklung des Enzymprofils im Blut von Kälbern und Lämmern in der neonatalen Adaptationsperiode. *Berl Muench Tierarztl Wochenschr* 1983; 96: 431–438
- [8] Brown CM. Uncertainties in the significance, diagnosis, and treatment of failure of passive transfer in foals. *Int Soc Vet Perinatol* 1990; 3 (2): 1–2; 8–11
- [9] Cash RSG. Colostral quality determined by refractometry. *Equine Vet Ed* 1999; 11 (1): 36–38
- [10] Chavatte F, Clément F, Cash R et al. Field determination of colostrum quality by using a novel, practical method. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1998; 44: 206–209
- [11] Chevalier-Clement F, Genin C. Observations on foaling Thoroughbred and draught mares. *Equine Vet J* 1988; 5: 63
- [12] Clabough DL. Factors associated with failure of passive transfer in Standardbred foals. *Proc Annu Vet Med Forum Am Coll Vet Intern Med* 1990; 8: 555–558
- [13] Cowles RR, Copeland DD, Corbly HS et al. A new test for the detection of immunoglobulin levels in the neonatal foal. *Proc Ann Conv Am Assoc Equine Pract* 1983; 29: 415–418
- [14] Crawford TB, Perryman LE. Diagnosis and treatment of failure of passive transfer in the foal. *Equine Pract* 1988; 2 (1): 17–23
- [15] Dascanio J, Ley W, Warnick L et al. Effect of temperature, total milk solids, milk fat, milk lactose, and milk protein on the prediction of equine colostrum immunoglobulin from specific gravity. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1995; 41: 15–17
- [16] Davis DG, Schaefer DMW, Hinchcliff KW et al. Measurement of serum IgG in foals by radial immunodiffusion and automated turbidimetric immunoassay. *J Vet Intern Med* 2009; 19: 93–96
- [17] Day MJ, Schultz RD. Immune system ontogeny and neonatal immunology. In: Day MJ, Schultz RD, eds. *Veterinary Immunology – Principles and Practice*. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press 2014; 213–220
- [18] Erhard MH, Luft C, Remler HP et al. Assessment of colostrum transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. *J Anim Physiol A Anim Nutr* 2001; 85: 164–173
- [19] Flaminio MJB, Rush BR, Shuman W. Peripheral blood lymphocyte subpopulations and immunoglobulin concentrations in healthy foals and foals with *Rhodococcus equi* pneumonia. *J Vet Intern Med* 1999; 13: 206–212
- [20] Graßl M, Ulrich T, Wehrend A. Inzidenz und Letalität häufiger neonataler Erkrankungen beim Fohlen während der ersten 10 Tage postnatal in einer Veterinärklinik. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2017; 45: 357–361
- [21] Hemberg E, Einarsson S, Kútivölgyi G et al. Occurrence of bacteria and polymorphonuclear leukocytes in fetal compartments at parturition; relationships with foal and mare health in the peripartum period. *Theriogenology* 2015; 84: 163–169
- [22] Higgins WP, Gillespie JH, Robson DS. Studies of maternally-acquired antibodies in the foal to equine influenza A and equine rhinopneumonitis. *Equine Vet J* 1987; 23: 116–118
- [23] Hoffman AM, Viel L, Prescott JE. Microbiologic changes during antimicrobial treatment and rate of relapse of distal respiratory tract infections in foals. *Am J Vet Res* 1993; 54: 1008–1014
- [24] Holznaegel DL, Hussey S, Mihalyi JE et al. Onset of immunoglobulin production in foals. *Equine Vet J* 2003; 35 (6): 620–622
- [25] Hurcombe SDA, Matthews AL, Scott VHL et al. Serum protein concentrations as predictors of serum immunoglobulin G concentration in neonatal foals. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2012; 22 (5): 73–79
- [26] Jeffcott LB. Perinatal studies in Equidae: with special reference to passive transfer of immunity [Ph.D. Thesis]. University of London; 1971
- [27] Jeffcott LB. Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. *Biol Rev Camb Philos Soc* 1972; 47: 439
- [28] Jeffcott LB. The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. *J Reprod Fert Suppl* 1975; 23: 727–733
- [29] Jeffcott LB. Übertragung der passiven Immunität beim neugeborenen Fohlen. *Prakt Tierarz* 1976; 3: 158–164
- [30] Kohn CW, Knight D, Hueston W et al. Colostral and serum IgG, IgA and IgM concentrations in Standardbred mares and their foals at parturition. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 64–68
- [31] Koke K, McGrath S, Cole K. Immunoglobulin concentrations in pre and post-foaling mammary secretions. *J Equine Vet* 2017; 52: 49–63
- [32] Kühn W. Die passive Immunisierung und der Fehlerhafte Passive Transfer (FFT) von Immunoglobulinen bei neugeborenen Fohlen. *Prakt Tierarz* 1991; 11: 060–069; 983–998
- [33] Lavole JP, Spensley MS, Smith BP et al. Colostral volume and immunoglobulin G and M determinations in mares. *Am J Vet Res* 1989; 50: 466–470
- [34] Leblanc MM. Use of a modified hydrometer to assess immunoglobulin content in mare colostrum. *Proc Am Assoc Equine Pract* 1986; 31: 157–162
- [35] Leblanc MM, Tran T, Pritchard EL. Factors influencing passive transfer of immunity in foals. *Proc Int Conf Vet Perinat* 1990; 2: 18
- [36] Luft CS. Untersuchungen zur systemischen Verfügbarkeit von Immunoglobulin G beim neugeborenen Fohlen [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität München; 2000
- [37] Markiewicz-Keszycza M, Czysale-Runowska G, Wojtowski J et al. Influence of stage of lactation and year season on composition of mares colostrum and milk and method and time of storage on vitamin C content in mares' milk. *J Sci Food Agric* 2015; 95: 2279–2286
- [38] Markus RG. Bestimmung der Immunoglobulin G-Konzentration mittels Refraktometrie, Kolostrometrie und ELISA-Technik sowie Untersuchung weiterer Inhaltsstoffe im Stutenkolostrum [Dissertation]. Hannover: Tierärztliche Hochschule Hannover; 2005
- [39] McCue PM. Evaluation of a turbidimetric immunoassay for measurement of plasma IgG concentration in foals. *Am J Vet Res* 2007; 68 (9): 1005–1009
- [40] McGuire TC, Crawford TB. Passive immunity in the foal: measurement of immunoglobulin classes and specific antibody. *Am J Vet Res* 1973; 34 (10): 1299–1303
- [41] McGuire TC, Crawford TB, Hallowell AL et al. Failure of colostrum immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. *J Am Vet Med Assoc* 1977; 170 (11): 1302–1304
- [42] Metzger N, Hinchcliff KW, Hardy J et al. Usefulness of a commercial equine IgG test and serum protein concentration as indicators of

- failure of transfer of passive immunity in hospitalized foals. *J Vet Intern Med* 2006; 2: 382–387
- [43] Meyer H, Kamphues J. Grundlagen der Ernährung von Neugeborenen. In: Wulser K, Bostedt H, Hrsg. Neugeborenen- und Säuglingskunde der Tiere. 1. Aufl. Stuttgart: Enke; 1990: 55–71
- [44] Morris DD, Melz DA, Schad Merryman G. Passive transfer failure in horses: incidence and causative factors on a breeding farm. *Am J Vet Res* 1989; 46 (11): 2294–2299
- [45] Patterson WH, Brown CM. Increase of serum γ -glutamyltransferase in neonatal Standardbred foals. *Am J Vet Res* 1986; 47 (11): 2461–2463
- [46] Pearson RC, Hollowell AL, Bayly WM et al. Times of appearance and disappearance of colostral IgG in the mare. *Am J Vet Res* 1984; 45 (1): 186–190
- [47] Perryman LE. Immunological management of young foals. *Compend Contin Educ* 1981; 3: 223–228
- [48] Perryman LE, McGuire TC. Evaluation for immune system failures in horses and ponies. *J Am Vet Med Assoc* 1980; 176 (12): 1374–1377
- [49] Pusterla N, Berger Pusterla J, Spler S et al. Evaluation of the SNAP Foal IgG test for the semiquantitative measurement of immunoglobulin G in foals. *Vet Rec* 2002; 151: 258–260
- [50] Riggs MW. Evaluation of foals for immune deficiency disorders. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1987; 3 (3): 515–528
- [51] Roscher K. Hämatologie und klinische Chemie. In: Fey K, Kolm G, Hrsg. Fohlenmedizin. 2. Aufl. Stuttgart: Enke; 2011: 178–190
- [52] Rouse BT. The immunoglobulins of adult equine and foal sera: A quantitative study. *Br Vet J* 1971; 127 (1): 45–52
- [53] Rumbaugh GE, Ardans AA, Ginno D. Measurement of neonatal equine immunoglobulins for assessment of colostral immunoglobulin transfer: comparison of single radial immunodiffusion with the zinc sulfate turbidity test, serum electrophoresis, refractometry of total serum protein, and the sodium sulfite precipitation test. *J Am Vet Med Assoc* 1978; 172: 321–325
- [54] Schneider F, Wehrend A. Qualitätsbeurteilung von bovinem und equinem Kolostrum – Eine Übersicht. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2019; 161 (5): 287–297
- [55] Schulte J. Untersuchung über Proteinfractionen im Blut und in der Milch von Pferden im Hinblick auf ihre Bedeutung in der Fohlenzucht [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 1978
- [56] Sheoran AS, Timoney JF, Holmes MA et al. Immunoglobulin isotypes in sera and nasal mucosal secretions and their neonatal transfer and distribution in horses. *Am J Vet Res* 2000; 61: 1099–1105
- [57] Sitters S, Stout T, McCue M. Evaluation of a turbidimetric immunoassay (TIA) for measuring IgG concentrations in mare colostrum [doctoral thesis]. Utrecht, The Netherlands: Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Equine Sciences; 2008
- [58] Sitzenstock F, Najorka J, Venner M et al. Der Immunglobulinstatus im Kolostrum von Zuchtstuten. *Züchtungskunde* 2016; 88 (3): 199–207
- [59] Tyler-McGowan CM, Hodgson JL, Hodgson DR. Failure of passive transfer in foals: incidence and outcome on four studs in New South Wales. *Aust Vet J* 1997; 75 (1): 56–59
- [60] Ulrich T. Erkrankungshäufigkeit und prognostische Bedeutung von ausgewählten Laborparametern beim neugeborenen Fohlen [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2009
- [61] Unterstab W. Untersuchung zur IgG-Bestimmung beim neugeborenen Fohlen [Dissertation]. Gießen: Justus-Liebig-Universität Gießen; 2016
- [62] Venner M, Markus RG, Strutzberg-Minder K et al. Evaluation of immunoglobulin G concentration in colostrum of mares by ELISA, refractometry and colostrometry. *Berl Muench Tierarztl Wochenschr* 2008; 121 (1–2): 66–72
- [63] Waelchli RO, Lutz H, Hermann M et al. Klinisch-chemische Blutparameter beim Fohlen in den ersten zwei Lebensmonaten. *Schweiz Arch Tierheilkd* 1992; 134: 471–482
- [64] Waelchli RO, Hassig M, Eggenberger E et al. Relationships of total protein, specific gravity, viscosity, refractive index and latex agglutination to immunoglobulin G concentration in mare colostrum. *Equine Vet J* 1990; 22 (1): 39–42
- [65] Wagner B. Immunoglobulins and immunoglobulin genes of the horse. *Dev Comp Immunol* 2006; 30: 155–164
- [66] Warko G, Bostedt H. Zur Entwicklung der IgG-Konzentration im Blutserum neugeborener Fohlen. *Tierarztl Prax* 1993; 1: 528–535

3 Material/Methode und Ergebnisse

3.1 Publikation 2

Comparison of Different Methods to Determine the Absorption of Colostral IgG in Newborn Foals

Maren Sievert, Gerhard Schuler, Kathrin Büttner, Axel Wehrend

eingereicht: 24.02.2022

akzeptiert: 09.05.2022

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104008>

Journal of Equine Veterinary Science 114 (2022)

© Elsevier Inc.

Beschreibung des Eigenanteils:

Studienplanung: A. Wehrend, G. Schuler

Studiendurchführung: M. Sievert (Probensammlung, Probenbestimmung) G. Schuler und K. Büttner (Statistik)

Manuskripterstellung: M. Sievert

Revision des Manuskriptes: M. Sievert, G. Schuler, A. Wehrend



Comparison of Different Methods to Determine the Absorption of Colostral IgG in Newborn Foals

Maren Sievert^{a,*}, Gerhard Schuler^a, Kathrin Büttner^b, Axel Wehrend^a

^a Clinic of Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals with Ambulatory Service, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany

^b Unit for Biomathematics and Data Processing, Justus Liebig University Gießen, 35392 Gießen, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 February 2022

Received in revised form 8 May 2022

Accepted 9 May 2022

Available online 14 May 2022

Keywords:

Foal

Hypogammaglobulinemia

IgG

ELISA

ABSTRACT

The timely diagnosis of abnormalities in the passive transfer of colostral immunoglobulins is important for the health and development of newborn foals. This study investigated three different methods for measuring immunoglobulin G concentration in neonatal foals. Comparison of a commercial SNAP assay, total protein concentration determination, and total globulin calculation by subtracting the albumin fraction from total protein as an indirect parameter was performed on a quantitative ELISA, which served as a reference method. The study included 119 samples from 148 foals between the age of 1 and 6 days. A blood concentration of 800 mg/dL was considered to indicate adequate absorption of immunoglobulins, and a concentration of less than 400 mg/dL was considered to be hypogammaglobulinemia. The sensitivity of the SNAP test was 64.5% and specificity was 94.7% for diagnosing sufficient absorption of immunoglobulin G at a value of 800 mg/dL. A value of 54 g/L was found to be most appropriate for the use of total protein and provided a sensitivity of 67.3% and specificity of 84.2%. For total globulins, the most appropriate value was 27 g/L, which yielded a sensitivity of 74.5% and specificity of 81.6%. At values under 400 mg/dL, the sensitivity of the SNAP test was 89.4% and the specificity was 83.0%. Here, the most suitable value for the total protein was 51 g/L. This provides a sensitivity of 65.2% and a specificity of 76.8%. The most suitable concentration for the use of total globulin was determined to be 24 g/L, which provided a sensitivity of 75.8% and a specificity of 78.1%. The study and its results show that the SNAP test, the TP, and the TP-A method perform similarly well compared to the ELISA in determining IgG concentration of ≥ 800 mg/dL. Based on the 95% confidence intervals, however, the Snap test and the TP-A method appear to perform similarly well but better than the TP approach for IgG concentrations < 400 mg/dL.

© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Inc.
This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

^{*} Conflict of interest statement: None. I certify that I have NO affiliations with or involvement in any organization or entity with any financial interest (such as honoraria; educational grants; participation in speakers' bureaus; membership, employment, consultancies, stock ownership, or other equity interest; and expert testimony or patent/licensing arrangements), or nonfinancial interest (such as personal or professional relationships, affiliations, knowledge or beliefs) in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

^{*} Animal welfare/ethical statement: All samples were taken as part of health surveillance and diagnosis. The residual blood was used for scientific investigations (permission: k1V8-2017). Hereby, I (Maren Sievert) consciously assure that for the manuscript (Comparison of Different Methods to Determine the Absorption of Colostral IgG in Newborn Foals) the following is fulfilled:

This material is the authors' own original work, which has not been previously published elsewhere.

The paper is not currently being considered for publication elsewhere.

The paper reflects the authors' own research and analysis in a truthful and complete manner.

The paper properly credits the meaningful contributions of co-authors and co-researchers.

The results are appropriately placed in the context of prior and existing research.

All sources used are properly disclosed (correct citation). Literally copying of text must be indicated as such by using quotation marks and giving proper reference.

All authors have been personally and actively involved in substantial work leading to the paper, and will take public responsibility for its content.

The violation of the Ethical Statement rules may result in severe consequences.

To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

I agree with the above statements and declare that this submission follows the policies of Solid State Ionics as outlined in the Guide for Authors and in the Ethical Statement.

^{*} Corresponding author: Maren Sievert, Clinic for Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals with Veterinary Outpatient Clinic, Justus Liebig University Gießen, 35392 Gießen, Germany.

E-mail address: maren.sievert@vetmed.uni-giessen.de (M. Sievert).

<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104008>

0737-0806/© 2022 The Author(s). Published by Elsevier Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Table 1

Comparison of SNAP test, total protein (TP) and total globulins (TP-A) with reference methods to detect hypogammaglobulinemia in newborn foals in literature. The units were expressed in mg/dL to improve comparability.

Analyzed Method	Reference Method	Threshold Value in mg/dL	Sensitivity in %	Specificity in %	Age Range of Foals	Status of Health	Foal Number/ Sample size	Reference
SNAP	RID	<400 <800	88.9 81.0	95.8 94.7	2 – 24 hr	healthy and sick	60/100	16
SNAP	RID	≤400 ≤800	90 95	79 52	< 19D	sick	67/67	17
SNAP	RID	<400 <800	76 88	95 90	24 – 27 hr	healthy	201/198	19
TP	RID	<400 <800	51.9 42.9	95.9 96.6	2 – 24 hr	healthy and sick	60/100	16
TP	RID	≤800	94	47	< 19 D	sick	67/67	17
TP	RID	≤400 ≤800	86.1 82.9	70.9 72.2	not specified	healthy and sick	230/232	21
TP	RID		94.11	83.33	1 – 98 D	healthy and sick	38/38	23
TP-A	RID	<400 <800	88.6 87.5	89.6 80.2	6 – 24 hr	healthy	60/360	11
TP-A	Electrophoresis	<400 <800	97.7 90.4	90.5 87.9	6 – 24 hr	healthy	60/360	11
TP -A	Electrophoresis	<200 <400	92.3 90 90.7	79 76.9 76.9	0 – 25 D	not specified	56/56	24
		<800						

RID, Radial immunodiffusion.

1. Introduction

Due to the epitheliochorial structure of the equine placenta, foals are born almost agammaglobulinemic. After birth, they depend on the transfer from the mare's colostrum for an adequate supply of immunoglobulins [1]. Without enough good-quality colostrum, postnatal hypogammaglobulinemia, also known as Failure of Passive Transfer (FPT), develops [2]. This is the fourth most common abnormality in newborn foals under hospital conditions [3]. Some authors do not consider serum IgG levels to be directly related to disease severity and foal survival [4], but hypogammaglobulinemia is considered to be a risk factor for developing the serious infectious disease with a fatal outcome [3,5]. Due to the high risk of infection, early detection of hypogammaglobulinemia and prompt treatment are crucial for the health and development of foals [1,6]. The literature is conflicted about the definitions of Partial Failure of Passive Transfer (PFPT) and FPT. However, the threshold concentration for sufficient absorption of IgG under hospital conditions is at least 800 mg/dL in the plasma or serum of the foal [1,6,7]. A PFPT is present when concentrations are between 400 and 800 mg/dL, and an FPT is found at concentrations below 400 mg/dL 24 hours post-natal [8–10].

Various laboratory-based and laboratory-independent testing methods exist for determining the IgG concentration in the blood of foals. Radial immunodiffusion (RID) is considered to be the gold standard for measurement [11]. However, serum electrophoresis could be a competitive alternative, since it may be more reliable and accurate [11,12]. These laboratory-based tests are labor-intensive and time-consuming. Conversely, the simpler and more rapid nonlaboratory tests usually have poor reliability. Nevertheless, infrared spectroscopy and turbidimetric immunoassay, offer similar overall performance, but provide quantitative IgG concentrations faster and at a lower cost [13,14]. The turbidimetric immunoassays, as well as other test methods (zinc sulfate turbidity test, the glutaraldehyde coagulation test, and other rapid semi-quantitative on-site tests), are available as commercial test kits [15,16].

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISA) are also widely used. As this assay has high reproducibility and sensitivity, it is suitable for routine diagnostics [10]. An ELISA-based rapid test is the semi-quantitative SNAP Foal IgG test (Idexx Laboratories, Inc., Westbrook USA) [17]. This test can also be carried out under field conditions within a few minutes. Various studies have examined the SNAP Foal IgG test and compared it with other diagnostic tests [16–19]. In this studies, sensitivities of 81%–95% and specificities of 52%–95% for the detection of serum IgG concentrations of <400 mg/dL or <800 mg/dL were achieved (Table 1).

Measurement of the total protein concentration in blood serum can also be used for the diagnosis of FPT in foals [9,20]. Refractometers give a quick and inexpensive screening method and have a good sensitivity for the diagnosis of FPT [21]. In bovine neonates, determining the total protein concentration is routinely used to assess antibody absorption because it is rapid, simple, and inexpensive [22]. In equine neonatal medicine the difficulty lies in establishing appropriate threshold values that result in clinically useful sensitivity and specificity for IgG concentrations greater than 800 mg/dL, between 800 and 400 mg/dL and less than 400 mg/dL. Different authors describe sensitivities and specificities associated with different cut-off values (Table 1) [16,17,21,23].

Furthermore, it was investigated whether the concentration of total globulins calculated from the difference between total protein and albumin provides a more reliable diagnosis of FPT [11,24]. This method seems to provide better sensitivity and specificity than the determination of total protein alone (Table 1). Here, as in the measurement of total protein, the determination of suitable cut-off values is of great importance for the reliable diagnosis of an FPT.

While research exists comparing the individual methods listed here, no study directly compares the SNAP test, the measurement of total protein, and the calculation of total globulin on the same samples. Therefore, this study was conducted with a special focus on a wide distribution of samples in the low and medium measurement ranges, including samples immediately taken after birth (i.e., before the foal's intake of colostrum).

The purpose of this study was to compare three measurement methods that are quick to perform and inexpensive, to detect the most suitable method for determine serum IgG concentrations in the newborn foal.

2. Materials and Methods

2.1. Serum Samples

Samples were collected between April 2018 and September 2019 from inpatient and outpatient foals at the Clinic for Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals at the Veterinary Outpatient Clinic of Justus Liebig University Giessen, Germany. These foals were presented at the clinic due to illness; either were healthy neonates of sick mares or were born at the clinic. They were included in the study at an age immediately after birth up to 6 days post natum. Furthermore, foals of any breed and sex were included and there was no exclusion from the study based on the health status of the foals. Foals that had already been treated by plasma transfusion prior to presentation were excluded from the study.

All samples were taken as part of health surveillance and diagnosis of potential diseases, after which residual blood was used for scientific investigations (permission: kTV8-2017).

Blood samples were taken from the external jugular vein. Sampling was performed after prior disinfection of the puncture site using disposable cannulas (Sterican 20G 1 1/2, Braun, Melsungen, Germany) and two sterile of 4 mL serum tubes (Tube 4 mL, Sarstedt AG & Co.KG, Nürnberg, Germany).

After the samples had clotted, they were immediately centrifuged in the laboratory for 5 minutes at 1680 g (Rotina 35R, Hettich Lab Technology, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttingen, Germany). The serum was pipetted and filled into universal tubes. Each sample was divided into four aliquots. Three aliquots were analyzed directly afterward for IgG concentration by means of SNAP test, measurement of total protein, and calculation of total globulin. The fourth aliquot was stored at -18°C until an ELISA test was performed.

2.2. Laboratory Analysis

Each aliquot was measured once by one of the three measurement methods (see below) and the ELISA as reference method.

The SNAP Foal IgG test is an ELISA-based, commercial, semi-quantitative rapid test (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook). Based on color development, the IgG concentration is classified into three categories: <400 mg/dL, 400–800 mg/dL, and >800 mg/dL.

The total protein was determined by means of a handheld refractometer (HRM18-T, Krüss GmbH, Hamburg, Germany) that provides a measurement in g/dL. The results were converted into g/L. The measurement error for hand refractometer was ± 0.2 g/dL.

Albumin was measured by photometric measurement using the bromocresol green method. For this purpose, a reagent from Randox (Randox Laboratories Ltd., Crumlin, UK) was used, and the sample was subsequently measured using the photometer "PCP 6121" (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) at a wavelength of 578 nm and a temperature of 20°C . The albumin concentration was calculated from the absorbance values using a previously established standard curve. Total globulin concentration was subsequently calculated from the difference between the total protein and the albumin concentrations and is also presented as g/L.

An ELISA assay was established as the reference method for this study. Commercially available reagents were used, and the assay was based on the principle of the sandwich ELISA. The test conditions employed in this study were determined and optimized in a series of preliminary experiments. In particular, checkerboard titrations were performed to determine the optimal dilution of capture and detector antibodies.

An ELISA microtiter plate (NUNC MaxiSorp, ThermoFisher Scientific, MA) was coated with the capture antibody AffiniPure Rabbit Anti-Horse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA). This capture antibody was applied at a 1:8000 dilution in a 0.1 M carbonate buffer at a pH of 9.6 to the ELISA microtiter plate and incubated at 4°C overnight. After the incubation phase, the microtiter plate was washed three times with a PBS-Tween wash buffer (PBS solution pH 7.45 with 0.05% Tween 20) to remove the excess antibody. This washing procedure was carried out after each incubation. The remaining free protein-binding sites on the microtiter plate were saturated with a blocking solution (PBS solution pH 7.45 with 1% m/v BSA) to reduce nonspecific binding. Thereafter standard curve points, controls, and samples diluted 1:300000 in PBS-Tween were plated in triplicate. The standard curve consisted of eight points in the concentration range between 0.8 and 100 ng/mL, prepared by serial dilution of purified equine IgG (ChromPure, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., PA Purity: Based on electrophoresis at an antigen concentra-

tion of 20 mg/mL, the pattern of precipitation against anti-horse whole serum is the same as that against anti-horse IgG. Fr fragment specific). Serum samples with known low or high IgG concentrations were included in the tests as controls.

After 30 minutes of incubation, the detector antibody (peroxidase-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Horse IgG [Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.]) was applied at a dilution of 1:4000 in PBS-Tween and incubated for 20 minutes. The next step was the incubation of the substrate solution (1-Step Turbo TMB-ELISA, Thermo Scientific, MA). The reaction was stopped after 10 minutes by the addition of sulphuric acid (0.2 M). After photometric measurement of the absorbance values in the ELISA reader (MRX^c Microplate Reader, Dynex Technologies, VA) at a wavelength of 450 nm, the IgG concentrations of the samples were calculated. If the measured values were outside of the standard curve, the samples were remeasured at a suitable higher or lower dilution.

The coefficients of variation of the inter-assay for samples from the low-measuring (<120 mg/dL) and high-measuring ranges (>500 mg/dL) were 6.4% and 5.6%, respectively. The respective intra-assay coefficients of variation for low-range and high-range samples were 13.6% and 4.6%. The laboratory did not have GLP certification.

2.3. Statistical Analysis

Statistical analyses were carried out using SAS 9.4. Program (SAS Institute Inc., 2013. Base SAS 9.4 Procedures Guide: Statistical Procedures, 2nd edition ed. Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC).

2.3.1. Correlation Coefficients

For statistical analyses, the ELISA functioned as the reference method. The measured values of the SNAP test, the total protein (TP), and the total globulin concentrations (calculated as the difference between total protein and albumin [TP-A]) were compared to the reference. The correlations were determined by the Spearman correlation coefficient. The results from the SNAP test were assigned to three categories: category 1 denoted the measurement of <400 mg/dL, category 2 comprised 400–800 mg/dL, and category 3 was the measurement of >800 mg/dL.

2.3.2. Overall Test Performance and Threshold Determination

The performance evaluation of each test and determination of threshold values was achieved by creating a Receiver Operating Characteristics (ROC) curve.

The thresholds were calculated separately for each of the three tests.

As previously discussed, IgG values of ≥ 800 mg/dL were defined as sufficient immunoglobulin absorption. IgG values of <400 mg/dL were defined as FIT [7–10].

3. Results

3.1. Study Population

One hundred forty-eight samples were collected from 119 foals of different horse breeds: 59 Warmbloods (49.6%), 18 ponies (15.1%), 13 Thoroughbreds (10.9%), 5 Quarter Horses (4.2%), 4 Cold Bloods (3.4%), and 20 of other breeds (16.8%). The age of the animals ranged between 1 hour and 6 days ($\bar{x} = 1$, IQR = 1). Most foals were between the age of 1 day ($n = 102$) and 2 days ($n = 26$). The age distribution of the foals included in the study is shown in Fig. 1.

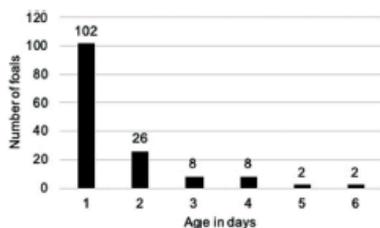


Fig. 1. Age distribution of the foals used in the study.

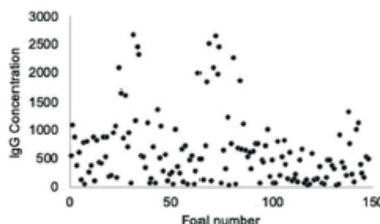


Fig. 2. Distribution of the serum IgG concentrations measured by ELISA in mg/dL of the foals included in the study. ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.

3.2. Descriptive Statistics

Measurement of serum samples by ELISA showed IgG concentrations in a range of 15.3–2660.0 mg/dL, 95% CI [518.65, 720.01]. In the measurement of total protein by refractometer the concentration ranged from 24.0 to 82.0 g/L, 95% CI [50.74, 53.60]. The measurement of TP-A showed concentration values between 8.5 and 54.3 g/L, 95% CI [23.50, 26.27]. The distribution of IgG concentrations measured by ELISA is shown in Fig. 2.

3.3. Correlation Coefficients

The ELISA and the TP measurements of IgG concentrations were moderately correlated ($\rho = 0.60$, $P < .0001$). The correlation between ELISA and TP-A showed a higher correlation ($\rho = 0.66$, $P < .0001$). A high Spearman rank correlation coefficient was found between ELISA and the SNAP test ($\rho = 0.79$, $P < .0001$).

3.4. Overall Test Performance and Threshold Determination

3.4.1. Detection of Sufficient Immunoglobulin Absorption (≥ 800 mg/dL)

The values of the SNAP test, TP, and TP-A can be used to determine the serum IgG concentration of the foal at an ELISA value of ≥ 800 mg/dL.

The area under the curve (AUC) of the ROC curve for the detection of IgG (ELISA) ≥ 800 mg/dL (adequate absorption of IgG) and < 800 mg/dL (inadequate absorption of IgG) using the SNAP test was 0.806, 95% CI [0.754, 0.858]. The Youden index, defined as the maximum distance between the ROC curve and the bisector, was used to determine a sensitivity of 64.5% and a specificity of 94.7% at a threshold value of three (> 800 mg/dL) (Fig. 3A/ Fig. 4A).

Using the TP, the AUC of the ROC curve was 0.794, 95% CI [0.719, 0.869]. The Youden index was used to determine a sensi-

tivity of 67.3% and a specificity of 84.2% at a cut-off value of 54 g/L (Fig. 3B/ Fig. 4B).

The AUC of the ROC curve using the TP-A was 0.819, 95% CI [0.745, 0.893]. The Youden index was used to determine a sensitivity of 74.5% and a specificity of 81.6% at a cut-off value of 27 g/L (Fig. 3C/ Fig. 4C).

3.4.2. Detection of an FPT (< 400 mg/dL)

The values of the SNAP test, TP, and TP-A can be used to estimate or determine the serum IgG concentration of the foal at a value of the ELISA of < 400 mg/dL (inadequate absorption of IgG).

The AUC of the ROC curve for the detection of IgG (ELISA) < 400 mg/dL using the SNAP test was 0.905, 95% CI [0.858, 0.953]. The Youden index was used to determine a sensitivity of 89.4% and a specificity of 83.0% at a cut-off value of two (800–400 mg/dL) (Fig. 5A/ Fig. 6A).

Using the TP, the AUC of the ROC curve was 0.786, 95% CI [0.713, 0.860]. The Youden index was used to determine a sensitivity of 65.2% and a specificity of 76.8% at a cut-off value of 51 g/L (Fig. 5B/ Fig. 6B).

The AUC of the ROC curve using the TP-A was 0.838, 95% CI [0.774, 0.902]. The Youden index was used to determine a sensitivity of 75.8% and a specificity of 78.1% at a cut-off value of 24 g/L (Fig. 5C/ Fig. 6C).

4. Discussion

In this study, three different rapid tests to determine IgG concentrations in newborn foals were evaluated, in order to verify which method is the most accurate when compared to the reference method, ELISA. Therefore, a self-developed quantitative ELISA was used as a reference method. Studies investigating the serum IgG concentration of newborn foals have already used a quantitative ELISA for the determination of IgG, since it is highly reproducible, sensitive, and can be performed much faster than other methods [10]. In addition, the quantitative ELISA provides accurate values within the measuring range and does not only achieve semi-quantitative results. Limitations of the ELISA are the complex technical implementation and the necessary dilution of the samples, which offers potential sources of error. It should also be noted that the laboratory in which the current study was conducted does not officially operate according to GLP standards. Nevertheless, all measurements have been verified using internal and external controls. Taking these factors into consideration and the knowledge that previous studies concerning IgG concentrations in bovine serum and colostrum samples showed that the ELISA correlates well with RID [25–27], the ELISA was found to be an adequate reference method for this study.

A good correlation between the ELISA and the SNAP test was found. The result of the SNAP test (AUC = 0.806) for serum IgG concentrations < 800 mg/dL confirms other studies that also found a lower sensitivity than specificity in detection [16,19]. As the sensitivity (64.5%) is significantly lower than in the previously cited studies (81%–88%), there is a clear limitation in the use as a screening test in this measurement range. Resulting from this, the SNAP test is of limited value to diagnose a sufficient absorption (≥ 800 mg/dL) of IgG for the population investigated in this study because it returns a larger number of false negatives than the ELISA.

However, the AUC of the ROC curves analysis for the SNAP test (AUC = 0.905) to detect serum IgG concentrations of < 400 mg/dL was high. Here, a similar result of sensitivity (89.4%) to the studies (88.9%–90%) could be achieved [16,17]. In contrast, to study by Metzger et al [17], a higher specificity (83%) was also found, so only a small number of foals with adequately maternal IgG absorption are diagnosed as undersupplied by the SNAP test. While the

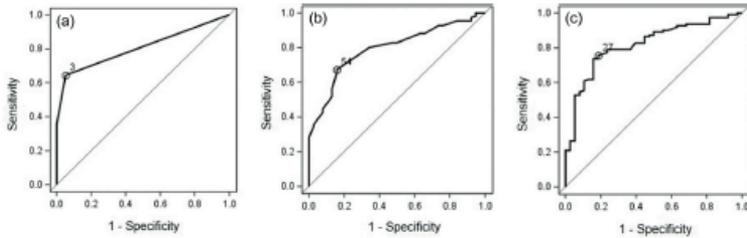


Fig. 3. (A) Receiver operating characteristic curve showing the sensitivity and specificity (solid line) of the SNAP test for the detection of IgG concentrations greater than 800 mg/dL in the serum of foals measured by ELISA. (B) Receiver operating characteristic curve showing the sensitivity and specificity (solid line) of the total protein (TP) for the detection of IgG concentrations greater than 800 mg/dL in the serum of foals measured by ELISA. (C) Receiver operating characteristic curve showing the sensitivity and specificity (solid line) of the total globulins (TP-A) for the detection of IgG concentrations greater than 800 mg/dL in the serum of foals measured by ELISA. ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.

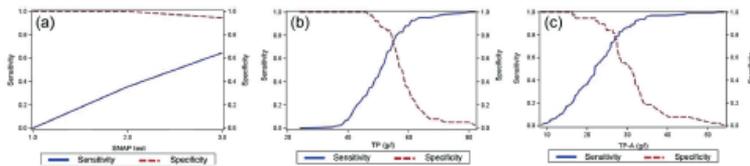


Fig. 4. (A) Sensitivity and specificity of the SNAP test compared to the ELISA for the detection of IgG concentrations greater than 800 mg/dL in the serum of foals. Definition of x-axis: 1.0: <400 mg/dL, 2.0: 400–800 mg/dL, 3.0: >800 mg/dL. (B) Sensitivity and specificity of the total protein (TP) compared to the ELISA for the detection of IgG concentrations greater than 800 mg/dL in the serum of foals. (C) Sensitivity and specificity of the total globulins (TP-A) compared to the ELISA for the detection of IgG concentrations greater than 800 mg/dL in the serum of foals. ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.

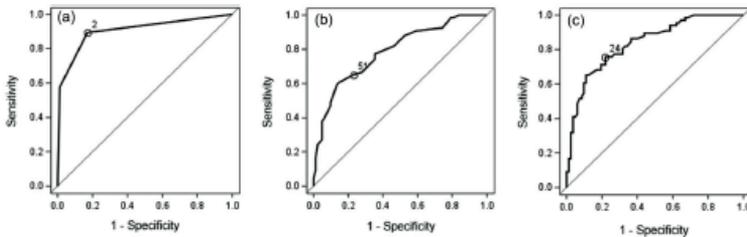


Fig. 5. (A) Receiver operating characteristic curve showing the sensitivity and specificity (straight line) of the SNAP test for the detection of IgG concentrations below 400 mg/dL in the serum of foals measured by ELISA. (B) Receiver operating characteristic curve showing the sensitivity and specificity (straight line) of the total protein (TP) for the detection of IgG concentrations below 400 mg/dL in the serum of foals measured by ELISA. (C) Receiver operating characteristic curve showing the sensitivity and specificity (straight line) of the total globulins (TP-A) for the detection of IgG concentrations below 400 mg/dL in the serum of foals measured by ELISA. ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.

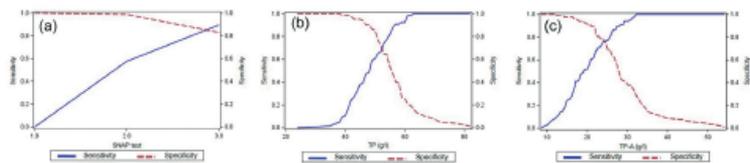


Fig. 6. (A) Sensitivity and specificity of the SNAP test compared to ELISA for the detection of IgG concentrations of below 400 mg/dL in the serum of foals. Definition of x-axis: 1.0: <400 mg/dL, 2.0: 400–800 mg/dL, 3.0: >800 mg/dL. (B) Sensitivity and specificity of the total protein (TP) compared to ELISA for the detection of IgG concentrations of below 400 mg/dL in the serum of foals. (C) Sensitivity and specificity of the total globulins (TP-A) compared to ELISA for the detection of IgG concentrations of below 400 mg/dL in the serum of foals. ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assays.

SNAP test showed poor results for the determination of sufficient IgG absorption, the test is suitable for diagnosing serum IgG concentrations below 400 mg/dL. This shows similar results to other studies which determined a high sensitivity (76%–90%) and specificity (79%–95.8%) for the detection of IgG concentrations below 400 mg/dL [16–18].

With regard to the determination of TP for concentrations below 800 mg/dL by refractometer, a lower result (AUC = 0.794) than in a previous report was found (AUC = 0.83) [21]. However, the cut-off value of 54 g/L used in this study showed a higher sensitivity (67.3%) than a cut-off value of 50 g/L [16]. The TP is also clearly limited in the detection of IgG concentrations <400 mg/dL and shows lower sensitivity (65.2%) and specificity (76.8%) than the other two test methods. Even when choosing the optimal cut-off value (51 g/L), the results are not satisfactory and lower than those in another study [21]. Also worth mentioning is the dependency of the TP on other factors for example the hydration status of the foals [28]. Thus, the TP is not suitable for detecting serum IgG concentrations <400 mg/dL and should only be used to a limited extent to diagnose FPT. However, other authors state that TP can still be an adequate test method if higher cut-off values, which result in higher sensitivity and lower specificity, are chosen [17,21]. The trade-off between sensitivity and specificity is considered to be reasonable as undetected FPT can lead to severe clinical infections and unnecessary treatments are not of particular risk for the foals.

The accuracy of TP-A for serum IgG concentrations was higher for <400 mg/dL (AUC = 0.838) than for ≥800 mg/dL (AUC = 0.819). Although the sensitivity and specificity for an IgG concentration of ≥800 mg/dL at a cut-off value of 27 g/L and <400 mg/dL at a cut-off value of 24 g/L were lower than described [11,24], they are still particularly suitable for the diagnosis of FPT. This is justified by the associated high sensitivity, which is, especially desirable to detect FPT. In comparison to TP, TP-A shows higher AUC values, which indicate a better overall test performance. The use of TP-A is more time-consuming than the other two rapid methods, although it can be carried out within 15 minutes. Furthermore, laboratory equipment must be available and, in addition, to calculating the values, the total protein must first be determined [11]. However, this could also be an advantage of the method, as the total protein is also available as a reference value. Another advantage of quantitative tests, such as TP and TP-A, is that they make it easier to check the success of therapy compared to semi-quantitative tests.

The similar results in the range of an IgG concentration of ≥800 mg/dL must be interpreted cautiously, as there was no balance between low and high samples in this study. There were significantly more low samples. This is due to the fact that the samples were taken from foals presented at a clinic and therefore few samples were taken from foals that had an adequate intake of immunoglobulin G from the mare's colostrum. In addition, the authors emphasized the importance of having many samples with low levels in the study, as this made it possible to find the most suitable test for the detection of FPT. Another limitation of the significance of this study is that the foals were not classified as sick or healthy so existing diseases can also have an unobserved influence on the test results.

5. Conclusions

The study has shown that the SNAP test, the TP and the TP-A method perform similarly well compared to the ELISA as the reference method in determining IgG concentration ≥800 mg/dL. Based on the 95% confidence intervals, the SNAP test and the TP-A method appear to perform similarly well but better than the TP approach for IgG concentrations <400 mg/dL.

Financial Disclosure

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jvevs.2022.104008.

References

- Raidal SL. The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a Thoroughbred breeding farm. *Aust Vet J* 1996;73:201–5.
- Jeffcott LB. The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;7:27–33.
- Gräßl M, Ulrich T, Wehrend A. Inzidenz und Letalität häufiger neonataler Erkrankungen beim Fohlen während der ersten 10 Tage post natum in einer Veterinärklinik. *Tierarztl Prax Ausgabe G Grosstiere - Nutztiere* 2017;45:357–61.
- Baldwin JL, Cooper WL, Vanderwall DK, Erb HN. Prevalence (treatment days) and severity of illness in hypogammaglobulinemic and normogammaglobulinemic foals. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:423–8.
- Crawford TB, McGuire TC, Hallowell AL, Macomber LE. Failure of colostral antibody transfer in foals: its effect, diagnosis and treatment. *Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract* 1978;265–73.
- McGuire TC, Crawford TB, Hallowell AL, Macomber LE. Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. *J Am Vet Med Assoc* 1977;170:1302–4.
- Morris DD, Meirs DA, Meryman GS. Passive transfer failure in horses: incidence and causative factors on a breeding farm. *Am J Vet Res* 1985;46:2294–9.
- Koterba AM, Brewer B, Drummond WH. Prevention and Control of Infection. *Vet Clin North Am Equine Pract* 1985;1:41–50.
- Tyler-McGowan CM, Hodgson JL, Hodgson DR. Failure of passive transfer in foals: incidence and outcome on four studs in New South Wales. *Aust Vet J* 1997;75:56–9.
- Erhard MH, Luft C, Remler HP, Stangassinger M. Assessment of colostrum transfer and systemic availability of immunoglobulin G in newborn foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2001;285:164–73.
- Tscheschick L, Venner M, Howard J. Comparison of IgG concentrations by radial immunodiffusion, electrophoretic gamma globulin concentrations and total globulins in neonatal foals. *Equine Vet J* 2017;49:149–54.
- Ujvari S, Schwarzwald CC, Fouché N, Howard J, Schoeter A. Validation of a Point-of-Care Quantitative Equine IgG Turbidimetric Immunoassay and Comparison of IgG Concentrations Measured with Radial Immunodiffusion and a Point-of-Care IgG ELISA. *J Vet Intern Med* 2017;31:1170–7.
- Riley CB, McClure JT, Low-Ying S, Shaw RA. Use of Fourier-transform infrared spectroscopy for the diagnosis of failure of transfer of passive immunity and measurement of immunoglobulin concentrations in horses. *J Vet Intern Med* 2007;21:828–34.
- McCue PM. Evaluation of a turbidimetric immunoassay for measurement of plasma IgG concentration in foals. *Am J Vet Res* 2007;68:1005–9.
- Rumbough GE, Arlans AA, Gimno D, Trimmershausen-Smith A. Measurement of neonatal equine immunoglobulins for assessment of colostral immunoglobulin transfer: comparison of single radial immunodiffusion with the zinc sulfate turbidity test, serum electrophoresis, refractometry for total serum protein, and the so. *J Am Vet Med Assoc* 1978;172:321–5.
- Davis R, Gignère S. Evaluation of five commercially available assays and measurement of serum total protein concentration via refractometry for the diagnosis of failure of passive transfer of immunity in foals. *J Am Vet Med Assoc* 2005;227:1640–5.
- Metzger N, Hinchcliff KW, Hardy J, Schwarzwald CC, Wittum T. Usefulness of a commercial equine IgG test and serum protein concentration as indicators of failure of transfer of passive immunity in hospitalized foals. *J Vet Intern Med* 2006;20:382–7.
- Pusterla N, Pusterla JB, Spier SJ, Puget B, Watson JL. Evaluation of the SNAP foal IgG test for the semiquantitative measurement of immunoglobulin G in foals. *Vet Rec* 2002;151:258–60.
- McClure JT, Miller J, DeLuca JL. Comparison of two ELISA screening tests and a non-commercial glutaraldehyde coagulation screening test for the detection of failure of passive transfer in neonatal foals. In: *Proc 49th Annu Conv Am Assoc Equine Pract New Orleans*; 2003. p. 301–5. 21–25 November 2003.
- Hircombe SD, Matthews AL, Scott VH, Williams JM, Kohn CW, Toribio RE. Serum protein concentrations as predictors of serum immunoglobulin G concentration in neonatal foals. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2012;22:573–9.
- Elsobhy I, Riley CB, McClure JT. Usefulness of digital and optical refractometers for the diagnosis of failure of transfer of passive immunity in neonatal foals. *Equine Vet J* 2019;51:451–7.
- Biswal SP, Dutta NK, Mishra PR. Estimation of total serum protein and immunoglobulin level in neonatal calves. *Indian Vet J* 1993;70:7–9.

- [23] Sedlinská M, Krejčí J, Vyskočil M. Evaluation of field methods for determining immunoglobulins in sucking foals. *Acta Vet Brno* 2005;74:51–8.
- [24] Fouaché N, Graulieres C, Howard J. Correlation between serum total globulins and gamma globulins and their use to diagnose failure of passive transfer in foals. *Vet J* 2014;202:384–6.
- [25] Lee S-H, Jaekal J, Bae C-S, Chung B-H, Yun S-C, Gwak M-J, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay, single radial immunodiffusion, and indirect methods for the detection of failure of transfer of passive immunity in dairy calves. *J Vet Intern Med* 2008;22:212–18.
- [26] Dunn A, Duffy C, Gordon A, Morrison S, Argüello A, Welsh M, et al. Comparison of single radial immunodiffusion and ELISA for the quantification of immunoglobulin G in bovine colostrum, milk and calf sera. *J Appl Anim Res* 2018;46:558–65.
- [27] Lopez AJ, Heinrichs AJ. Invited review : the importance of colostrum in the newborn dairy calf. *J Dairy Sci* 2022;105:2733–49.
- [28] Axon J, McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. Critical care - assessment. In: *Equine reproduction*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2011. p. 167–76.

3.2 Publikation 3

Serum immunoglobulin G concentration after plasma transfusion in neonatal foals with hypogammaglobulinemia in various health status

Maren Sievert, Gerhard Schuler, Axel Wehrend

eingereicht: 09.06.2022

akzeptiert: 02.08.2022

Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104093>

Journal of Equine Veterinary Science 117 (2022)

© Elsevier Inc.

Beschreibung des Eigenanteils:

Studienplanung: A. Wehrend, G. Schuler

Studiendurchführung: M. Sievert (Probensammlung, Probenbestimmung), G. Schuler (Statistik)

Manuskripterstellung: M. Sievert

Revision des Manuskriptes: M. Sievert, G. Schuler, A. Wehrend



Original Research

Serum immunoglobulin G concentration after plasma transfusion in neonatal foals with hypogammaglobulinemia in various health status

Maren Sievert*, Gerhard Schuler, Axel Wehrend

Clinic of Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals with Ambulatory Service, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University, Giessen, Germany



ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 June 2022

Received in revised form 30 July 2022

Accepted 2 August 2022

Available online 5 August 2022

Keywords:

Plasma transfusion

Foal

Hypogammaglobulinemia

ABSTRACT

Due to the time-limited intestinal uptake of colostral immunoglobulins, the suggested treatment of hypogammaglobulinemia in new-born foals is usually plasma transfusion. The aims of this study were twofold: firstly, to investigate the course of serum IgG concentration after plasma transfusion in newborn foals; and secondly, to determine the amount of transfusion required for a significant increase in serum IgG concentration. For this purpose, the IgG concentration was measured in 23 foals at three different points in time: before transfusion, 1 hour after transfusion, and 24 hours after transfusion. There was an increase in IgG concentration in the blood of 18 foals (78.3%). In five foals (21.7%), no increase in serum IgG concentration were detected after plasma transfusion. Transfusion of 1 mg IgG caused an average increase in IgG level of 0.03 mg/dl (0.001–0.268 mg/dl) 1 hour after transfusion. After 24 hours, the same amount of IgG caused a larger increase of 0.05 mg/dl (0.002–0.537 mg/dl). None of the foals demonstrated adverse reactions to the plasma transfusion. These values provide a guidance how much IgG is needed to increase serum IgG concentration to a desired level. However, this study has shown that there is a high variability in serum IgG concentration after plasma transfusion. Which highlights the necessity for monitoring IgG concentration following transfusion.

© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Equine neonates are almost born agammaglobulinaemic, due to the mare's epithelio-choral placentation type. Hypogammaglobulinemia (HGG) is a common abnormality in newborn foals under hospital conditions [1,2], which is a risk factor for developing serious infectious disease. The uptake of immunoglobulins from the colostrum occurs in the small intestine via pinocytosis by specialised epithelial cells of the equine neonate [3]. In the immediate postnatal period, epithelial cells are replaced by mature intestinal cells, which no longer allow the passage of macromolecules. As a result, the absorption rate decreases linearly and the absorption of immunoglobulins from the colostrum is complete within 24 hours [4]. Therefore, the uptake of immunoglobulins from the colostrum

via the intestine in the first hours of life is essential. As the period of resorption after colostrum intake is about 6 hours, the immunoglobulin G (IgG) in the foal's blood is measurable at this time, but is not yet at the maximum level. At a time of 12 hours after birth, values of approximately 800 mg/dl are considered sufficient, and maximum values can be detected between 18 and 24 hours after birth [4,5]. Due to the temporal limitation of intestinal absorption, plasma transfusion is the method of choice for the treatment of HGG at a later stage [6].

A number of studies investigate different direct and indirect diagnostic possibilities for the detection of HGG [7]. However, the literature yields far fewer studies regarding the amount of transfusion required to be effective and the course of IgG in the blood of foals following plasma transfusions. Only little information is available on whether and how many foals do not react to a transfusion with an increase in serum IgG concentration.

A study investigating the efficacy of transfusion in 62 hospitalised foals described an average increase in IgG concentration of 1027 ± 400 mg/dl 24 hours post-plasma transfusion [8]. A previous study showed that the increase in IgG content in foal serum (expressed as a percentage of IgG content per litre of plasma administered) was between 11% and 21% [9]. The amount of IgG needed to reach a serum IgG concentration of >800 mg/dl is between 46g

Conflict of interest statement: The authors declare no conflicts of interest.

Animal welfare/ethical statement: All samples were taken as part of health surveillance and diagnosis. The residual blood was used for scientific investigations (permission: k1V8-2017).

* Corresponding author at: Maren Sievert, Clinic of Obstetrics, Gynecology and Andrology of Large and Small Animals with Ambulatory Service, Faculty of Veterinary Medicine, Justus-Liebig-University, Frankfurter Straße 106, 35392 Giessen, Hessen, Germany.

E-mail address: maren.sievert@vetmed.uni-giessen.de (M. Sievert).

<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2022.104093>

0737-0806/© 2022 Elsevier Inc. All rights reserved.

and 65 g of IgG [10]. Other authors report that theoretically predicted IgG concentrations were not reached after plasma transfusion [11].

The aim of this study was to describe the course of IgG concentration after plasma transfusion in newborn foals with HGG and to give a guidance on the amount of plasma needed to reach a sufficient serum IgG concentration. In addition, the most appropriate point in time to measure the IgG serum concentration after the transfusion was determined.

2. Materials and methods

2.1. Serum samples

This study included hospitalized foals that required plasma transfusion due to HGG. The foals included in the study were from 24 to 72 hours of age. There was no exclusion from the study based on the health status of the foal and foals of any breed and sex were included. Foals, that were already treated with plasma transfusion were excluded from the study. HGG was diagnosed when the quantitative sandwich ELISA, which was used in this study, showed an IgG level below 800 mg/dl [12].

In addition to the plasma transfusion, foals received further drug therapy adapted to their disease and health status. Thus, all foals received an initial supply consisting of 2 mg/kg vitamin B orally (Vit B-Komplex B1 forte, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn), 5 mg/kg vitamin E + 0.2 mg/kg selenium s.c. (Vitamin-E-Selenium ad us. vet. 150 + 1.1 mg/ml, LWISTO c/o aniMedica GmbH, Senden-Büsenell), 3 ml vitamin ADEC orally (ADEC-Mulgat, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn), 5000 IE. tetanus serum s.c. (Tetanus-Serum WDT, WDT - Wirtschaftsgenossenschaft Deutscher Tierärzte eG, Garbsen) and one dose Parapoxvirus ovis D1701 s.c. (Zylexis, Zoetis Deutschland GmbH, Berlin). Foals with hypogammaglobulinemia received an additional antibiotic therapy of 20 mg/kg amoxicillin i.v. (Belamox 200 mg/ml, Bela-Pharm GmbH & Co. KG, Vechta) and 6.6 mg/kg gentamicin i.v. (Genta 100 mg/ml, CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH, Burgdorf) and 0.5 mg/kg flunixin-meglumine (FluMega nova 5%, Serumwerk Bernburg Tiergesundheits GmbH, Bernburg). Mild diarrhoea was treated with stypitics and as well as proptotics and dietary supplements.

All samples were taken as part of diagnostics and health surveillance, after which residual blood was used for scientific investigations (permission: kTV8-2017).

Blood was collected under sterile conditions from the external jugular vein (Sterican 20G 1 1/2, Braun, Melsungen, Germany). Serum samples were taken from the foals at three time points: before plasma transfusion, 1 hour after transfusion, and 24 hours after transfusion.

After the samples have clot, they were immediately centrifuged in the laboratory for five minutes at 1680 g (Rotina 35R, Hettich Lab Technology, Hettich GmbH & Co.KG, Tuttingen, Germany). The serum was pipetted, filled into universal tubes and stored at a temperature of -18°C until an ELISA test was performed.

2.2. Plasma transfusion

The plasma used for plasma transfusion was obtained from the in-house plasma bank. The donor animals were food-producing animals without a foreign residence, which had a body weight of 400 kg and were at least three years old. They were clinically healthy and properly vaccinated and dewormed. Blood was collected from the external jugular vein by aseptic sampling. A maximum of 15

ml per kg body weight was collected. The collected blood was transferred into sterile blood bags containing anticoagulants. The blood was then sedimented for 12 hours. The blood bags were then placed in a separation stand and the plasma was pressed into a transfer bag up to the buffy coat. Fractionated and labelled portions were then frozen and stored at -20°C. Storing time was not longer than 4 months.

The amount of IgG in the plasma bags from the plasma bank varied, as this was produced in-house. All foals except the two ponies received 1.5 l of plasma transfusion. The two ponies received 500 ml of plasma transfusion. Since there was a variation in the IgG content per liter of plasma, there was a difference in the total amount of IgG transfused to the foals. This ranged from 12706 mg to 96790 mg in the large horses and from 4596 mg to 6770 mg in the ponies.

Immediately prior to transfusion, the plasma was warmed up to 36°C in a water bath. The transfusion was carried out via an infusion catheter (PUR Infusion Catheter Set G-16, Walter Veterinärinstrumente e. K., Baruth, Germany), which was inserted into the foals' external jugular vein under sterile conditions and by means of a transfusion set (Sangofix Air, Braun, Melsungen, Germany). Initially, the transfusion was carried out very slowly while monitoring the general condition and continuously auscultating the foals' heart rates to detect reactions. If there were no adverse reactions, the transfusion rate was increased. The infusion rate was 10–30 ml/kg/h, so that the infusion lasted about 1.5 hours.

2.3. Laboratory analysis

In each serum sample from the foals at the different time points IgG concentration was measured by a quantitative sandwich ELISA. This ELISA was also used to determine the IgG concentration of the plasma to be transfused. The ELISA was developed using commercially available reagents. The standard curve consisted of eight points covering a range of 0.79–100.00 ng/ml. The coefficient of variation of the inter-assay for low-range samples (<120 mg/dl) was 6.4% and 5.6% for high-range samples (>500 mg/dl). The coefficient of variation of the intra-assay for samples from the low-measuring range was 13.6% and 4.6% for samples from the high-measuring range. The exact test set-up is described in a previously conducted study [12].

2.4. Calculation of the necessary IgG transfusion amount

The amount of plasma transfused was recorded for each foal by weighing the plasma bags. The IgG concentration and the amounts of plasma transfused were used to calculate the amount of IgG transfused.

The evaluation considered both the initial serum IgG concentration and the immunoglobulins transfused. Only values from foals that showed an increase in serum IgG concentration after transfusion were included in the calculation of the amount of IgG necessary to achieve an increase in serum.

From the available data, the mean values and range were calculated for time points of 1 hour and 24 hours after plasma transfusion.

3. Results

3.1. Study population

The sample consisted of 23 foals: 16 Warmblood (69.6%), two Thoroughbreds (8.7%), two Quarter Horses (8.7%), two Ponies (8.7%) and one Coldblood (4.3%).

HGG was found to be the primary and only disease in 43.5% of foals. In the remaining 56.5% of foals where HGG was detected

Table 1
Clinical disease, breed, weight, age and sex of the foals.

Foal number	Clinical disease	Breed	Weight (Kg)	Age (hours)	Sex
1	Meconium obstruction	Warmblood	66,1	24	Colt
2	None	Coldblood	84,3	24	Colt
3	SIRS	Warmblood	53,0	48	Colt
4	SIRS	Warmblood	42,9	24	Colt
5	Mild diarrhoea	Warmblood	56,2	48	Colt
6	Mild diarrhoea	Warmblood	51,1	72	Colt
7	None	Warmblood	54,2	24	Filly
8	Mild diarrhoea	Thoroughbred	44,9	72	Filly
9	None	Thoroughbred	53,6	24	Filly
10	None	Warmblood	40,1	24	Filly
11	None	Warmblood	64,2	48	Colt
12	SIRS	Warmblood	45,5	24	Filly
13	SIRS	Warmblood	50,1	72	Colt
14	None	Quarter Horse	32,2	24	Filly
15	Meconium obstruction	Warmblood	66,4	48	Colt
16	SIRS	Warmblood	50,7	24	Filly
17	SIRS	Warmblood	52,8	48	Filly
18	None	Warmblood	64,2	48	Colt
19	None	Warmblood	55,6	48	Colt
20	SIRS	Pony	12,5	24	Colt
21	Meconium obstruction	Quarter Horse	40,3	72	Colt
22	None	Pony	10,7	24	Filly
23	None	Warmblood	65,1	24	Colt

Table 2

Serum IgG concentration of foals before plasma transfusion 1 hour after transfusion and 24 hours after transfusion and the transcended IgG amount (X = no sample available).

Foal number	Before transfusion (mg/dl)	transcended amount of IgG (mg)	1 hour after transfusion (mg/dl)	24 hours after transfusion (mg/dl)
1	226	96790	430	576
2	789	34654	599	583
3	76.2	79868	804	702
4	136	51325	241	349
5	447	43664	509	252
6	45.6	36523	211	210
7	56.2	17245	222	535
8	233	36549	211	176
9	119	26254	394	1 350
10	104	84161	275	403
11	566	78684	521	1 220
12	342	12706	3 750	7 160
13	131	59910	1 350	231
14	55.4	29380	752	1 970
15	653	39088	387	1 140
16	161	30477	231	425
17	31.1	40132	75.1	X
18	25.5	32912	118	X
19	752	26348	666	X
20	204	6770	555	X
21	263	33202	470	X
22	218	4596	39.6	X
23	278	41757	115	X

in the blood test, another disease was also present. Of these, seven foals (53.8%) were treated for systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and six foals (46.2%) were presented to the clinic due to gastrointestinal diseases (meconium obstruction, diarrhoea). The clinical disease of the foals, breed, weight, sex and age are summarised in Table 1.

3.2. Results of plasma transfusion

Samples were taken from 16 foals at three points in time. Seven foals had a blood sample taken before transfusion and 1 hour after the plasma transfusion. In these seven cases, no 24 hours samples were available, as these foals died or were discharged from the hospital before this time. Initial IgG concentration of the foals, the values of the samples 1 hour and 24 hours after transfusion and the respective transcended IgG amount are summarised in Table 2.

There was a general increase in IgG concentration in the blood of 18 foals (78.3%). Out of these 18 foals an increase was present in 9 cases (50.0%) one and 24 hours after transfusion. Transfusion caused an increase only 1 hour after transfusion in one foal (5.6%), with an IgG concentration in the foal's blood below baseline at 24 hours. Two foals (11.1%) showed no increase in IgG concentration 1 hour after transfusion, with an increase in concentration recorded after 24 hours. In two cases (11.1%), the serum IgG concentration was higher 1 hour after transfusion than at 24 hours. Four foals showed an increase 1 hour after transfusion with no available sample after 24 hours (22.2%).

There was no increase in IgG concentration in the blood of five foals (21.7%). In two foals (8.7%), no increase in serum IgG concentration were detected 1 hour and 24 hours after plasma transfusion. In three foals no increase in serum IgG concentration were detected 1 hour after plasma transfusion with no available sample after 24 hours (13.0%).

3.3. Results of the transfusion calculation

One hour after plasma transfusion, a mean of $\bar{x} = 293.4$ mg (37–912 mg) of IgG was required to cause an increase of 1 mg/dl of IgG level in the foal's blood. The amount required to achieve an equivalent increase was reduced to $\bar{x} = 164.5$ mg (19–599 mg) after 24 hours.

Furthermore, it was shown that transfusion of 1 mg IgG in the first measurement period (1 hour) caused an average increase in the IgG level of the foals of $\bar{x} = 0.03$ mg/dl (0.001–0.268 mg/dl). After 24 hours, the same amount of IgG caused a larger increase of $\bar{x} = 0.05$ mg/dl (0.002–0.537 mg/dl).

4. Discussion

In this study, the course of IgG concentration in the blood of newborn foals after a plasma transfusion was presented, and the required transfusion amount for a significant increase in the IgG concentration was determined. The study was carried out on hospitalised foals that were presented due to an undersupply of immunoglobulins, with or without other diseases.

The IgG concentration was determined by a quantitative ELISA. As it has high reproducibility and sensitivity, and can be carried out significantly faster than radial immunodiffusion and electrophoresis, it is considered as a proper reference method in the existing literature [13]. The limitations of the ELISA are the complex technical implementation, as well as the necessary dilution of the samples, which offers an inherent source of variability. Therefore, the suitability of the ELISA was demonstrated and confirmed in a previously conducted study [12].

No significant difference in serum IgG concentration 24 and 72 hours after transfusion was detected in the literature [8,13]. For this reason and because a timely control of the transfusion success is essential for the adequate treatment of the foal none of the samples in this study were taken later than 24 hours after the transfusion. Since other studies describe an increase in serum IgG concentration immediately after a plasma transfusion, followed by a decrease in subsequent days, the time point of 1 hour after transfusion was also included in this study [9,14,15].

The main focus was to investigate whether the treated foals show an increase in serum IgG concentration after plasma transfusion and expected serum IgG concentrations were reached. Furthermore, the high variability of the increase in serum IgG concentration should be demonstrated.

While some authors describe that foals suffering from SIRS show a different IgG catabolism than foals showing HGG without further diseases [9,10,15], other studies show that there is no significant difference between septic and aseptic foals [8,13]. For this reason, sick and healthy foals were grouped together in this study. Another reason for not splitting the foals into these two groups is that SIRS may not be clinically diagnosed in the early stages, but may still have an impact on the foal's serum IgG concentration after transfusion. Thus, for the practicing veterinarian, this distinction is not initially of much use.

In this study, it was found that there is a large variability in the increase in serum IgG concentration after plasma transfusion and the amount of IgG required for a significant increase has a wide range. This wide range has also been found in other studies [8,10]. For example, Wilkens et al. described that a transfusion of 46 g or 65 g IgG is required for an increase in serum IgG concentration of 400 mg/dl [10]. Another study describes an average increase of 3.51 ± 1.46 g/l in the serum IgG concentration of 46 foals by a product with an IgG content of 25 g [14]. These studies already indicate the high variability and unpredictability of plasma transfusion. This is also evident in the study we conducted. For example, a warmblood foal that suffered from SIRS and was transfused

an IgG amount of 51325 g IgG showed a much smaller increase in serum IgG concentration than a warmblood foal that suffered from the same disease and was transfused only an IgG amount of 12706 g (Table 1 and 2, foals 4 and 12). These foals were of the same age and had similar body weights. This unpredictability of the increase in serum IgG concentration can also be reproduced in foals that had only hypogammaglobulinemia and no other disease. For example, a foal that received 84161 g IgG showed an increase in serum IgG concentration of 299 mg/dl 24 hours after transfusion, while a foal that received 29380 g IgG showed a much higher increase of 1915 mg/dl (Tables 1 and 2, foals 10 and 14). This deviation in the increase in serum IgG concentration was also demonstrated in the two ponies included in the study. While one suffering from SIRS showed an increase, the other without any disease showed a decrease in serum IgG concentration (Table 1 and 2, foals 20 and 22).

In addition, no increase in serum IgG concentration could be detected overall in about 22 % of the foals in this study. As previously explained, this concerned both foals affected by other diseases in addition to HGG, as well as foals exclusively affected by HGG. It is difficult to give a reason for the non-increase of the IgG concentration in these foals. It could be due to the further illnesses of the foals, but this cannot be the only reason, as foals that showed no further illness were also affected. Furthermore, it is possible that the amount of IgG needed also depends on the body weight of the foal and the severity of the HGG, respectively that the foals possibly consume the IgG again very soon after the transfusion. Moreover, an increase in the marginal cell pool or an altered catabolic rate may also be a cause of an unexpected and too low increase in the foal's serum IgG concentration. Furthermore, a degradation of IgG complexes formed between the infused IgG and antibodies present in the foal's blood may occur [16].

An initial control sample 1 hour after the end of the transfusion may be useful to detect foals that do not show an increase in serum IgG concentration. These can be transfused again at an early stage and thus achieve an adequate immunoglobulin supply more quickly. However, this needs to be verified on a larger number of cases and stratification of the categories, as only a small number of foals were available in the present study.

Furthermore, it has been shown that the serum IgG concentration of most foals showing an increase after plasma transfusion is higher 24 hours after the end of transfusion than 1 hour after the end of transfusion. This could be due to the change in distribution of IgG into the extravascular space and into the serum of the foal [8]. Therefore, foals showing an increase in serum IgG concentration 1 hour after the end of transfusion should also be monitored 24 hours later to determine the actual increase in serum IgG concentration.

It was also suggested that foals with total FPT would require a larger plasma volume than foals with partial FPT, as a greater amount of IgG would be absorbed into the extravascular spaces. However, this could not be proven by other studies [8] and also in the present study the samples indicate that it cannot be assumed that foals with total FPT need a larger amount of plasma.

The present results highlight and emphasize the need for a follow-up measurement. This is essential as the foals show very poor predictability of efficacy and response to plasma transfusion.

Plasma transfusion did not cause an adverse reaction in any foal. A study that also investigated the incidence of adverse reactions to plasma transfusion found an incidence of 9.7% in newborn foals, with all foals surviving adverse reactions [17]. It can be deduced that while plasma transfusion can cause adverse reactions, they are rare. Thus, due to the low risk of adverse reactions and the fact that plasma transfusion is the only way to transfer immunoglobulins, plasma transfusion should be performed in the presence of HGG.

5. Conclusion

In summary, the study provides guidance regarding how much IgG should be transfused for a noticeable increase in foals with HGG. The highly individualised response makes it necessary to monitor the success of the transfusion with follow-up measurements. In addition, the high individuality in the reaction of the foals emphasises that further research on this topic needs to be conducted to determine the best possible therapy for HGG.

Financial Disclosure

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

References

- [1] Raidal SL. The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a thoroughbred breeding farm. *Aust Vet J* 1996;73:201–6.
- [2] Grall M, Ulrich T, Wehrend A. Inzidenz und Letalität häufiger neonataler Erkrankungen beim Fohlen während der ersten 10 Tage post natum in einer Veterinärklinik. *Tierarztl Prax Ausgabe G Grosstiere - Nutztiere* 2017;45:357–61.
- [3] Day MJ, Schultz RD. Immune system ontogeny and neonatal immunology. *DAY MJ, SCHULTZ RD Vet Immunol Princ Pract Manson Publ Ltd* 2011;2:175–81.
- [4] Jeffcott LB. The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. *J Reprod Fertil Suppl* 1975;7:27–33.
- [5] LeBlanc MM. Immunologic considerations. *Equine Clin Neonatol* 1990;275–94.
- [6] Christmann U. Plasma Therapy in the Foal. *Equine Reprod Proc* 2021;707–9.
- [7] Sievert M, Krohn J, Wehrend A. [Immunoglobulin concentration in equine colostrum and blood of newborn foals as well as clinically relevant IgG evaluation methods - An overview]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 2019;47:298–307.
- [8] Francesca F, Jole M, Aliai I, Chiara C, Carolina C. Efficacy and safety of a commercial fresh-frozen hyperimmune plasma in foals with failure of passive transfer of immunity. *J Equine Vet Sci* 2017;48:174–81 e2.
- [9] LeBlanc MM. Responses to plasma transfusion in clinically healthy and clinically ill foals. *Proc Annu Conv Am Assoc Equine Pract* 1987;32:755–61.
- [10] Wilkins PA, Dewan-Mix S. Efficacy of intravenous plasma to transfer passive immunity in clinically healthy and clinically ill equine neonates with failure of passive transfer. *Cornell Vet* 1994;84:7–14.
- [11] Crawford TB, McGuire TC, Hallowell AL, Macomber LE. Failure of colostrum antibody transfer in foals: its effect, diagnosis and treatment. *Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.* 1978:265–73.
- [12] Sievert M, Schuler G, Blütznier K, Wehrend A. Comparison of different methods to determine the absorption of colostrum IgG in newborn foals. *J Equine Vet Sci* 2022;114:104008.
- [13] McTaggart C, Penhale J, Raidal SL. Effect of plasma transfusion on neutrophil function in healthy and septic foals. *Aust Vet J* 2005;83:499–505.
- [14] McClure JT, Deluca JL, Lunn DP, Miller J. Evaluation of IgG concentration and IgG subisotypes in foals with complete or partial failure of passive transfer after administration of intravenous serum or plasma. *Equine Vet J* 2001;33:681–6.
- [15] White SL. The use of plasma in foals with failure of passive transfer and/or sepsis. *Proc. Annu. Conv. Am. Assoc. Equine Pract.* 1990;35:215–18.
- [16] Knottenbelt DC, Holdstock N, Madigan JE. *Equine Neonatal Medicine and Surgery*. Elsevier Health Sciences Philadelphia 2004;1:396–9.
- [17] Harlefeldt LY, Keuler N, Peek SF. Incidence of transfusion reactions to commercial equine plasma. *J Vet Emerg Crit Care* 2010;20:421–5.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Fragestellung

4.1.1 Stellenwert der Immunglobulin-Bestimmung in der equinen Neonatologie

Ziel dieser Arbeit war es, drei schnell durchführbare Testverfahren zur Bestimmung der Serum-IgG-Konzentration von neonatalen Fohlen zu vergleichen.

Die Wichtigkeit von schnell durchführbaren Testverfahren erklärt sich durch den anatomischen Aufbau der equinen Plazenta und die Tatsache, dass das Fohlen nur in einem eng begrenzten Zeitraum fähig ist, Immunglobuline aus dem Kolostrum der Stute aufzunehmen (Warko & Bostedt, 1993). Durch den epithelio-chorealen Plazentationstyps der Stute werden Fohlen nahezu agammaglobulinämisch geboren und sind auf eine adäquate Versorgung mit Kolostrum von guter Qualität angewiesen, um ausreichend Immunglobuline aufzunehmen (Raidal, 1996). Die Aufnahme der kolostralen Immunglobuline ist sowohl durch die IgG-Konzentration im Kolostrum der Stute, welche nach erster Tränkeaufnahme sinkt (Venner et al., 2008), als auch durch die Veränderung der Darmepithelzellen des Fohlens, welche keinen Transfer von Makromolekülen mehr zu lassen (Jeffcott, 1972), zeitlich begrenzt. Sie erfolgt daher innerhalb der ersten 18 bis 24 Lebensstunden. Hat bis zu diesem Zeitpunkt keine ausreichende Aufnahme stattgefunden, besteht eine HGG (Jeffcott, 1975). Da sich aus dieser viele ernsthafte Erkrankungen entwickeln können (McGuire et al., 1977), ist eine frühzeitige Diagnostik der HGG für das Fohlen von enormer Wichtigkeit.

4.1.2 Notwendigkeit des Vergleichs der drei verwendeten Testverfahren

Es existieren derzeit einige laborabhängige und laborunabhängige Testverfahren für die Bestimmung der Serum-IgG-Konzentration des neonatalen Fohlens, welche sich in ihrer Sensitivität und Spezifität, aber auch in dem Aufwand der Durchführung und der zeitlichen Dauer unterscheiden. Da die Bestimmung der Serum-IgG-Konzentration zur Diagnose einer HGG häufig nicht unter Klinikbedingungen durchgeführt wird, ist es besonders wichtig, ein Testverfahren zu finden, dass für die Praxis zugänglich und

dort einfach und zuverlässig anwendbar ist. Der durchgeführte Test sollte dem Verwender*innen innerhalb von kurzer Zeit eine Aussage über die Serum-IgG-Konzentration des Fohlens liefern, so dass eine schnellstmögliche Behandlung stattfinden kann. Die drei Schnellverfahren, die hierfür verglichen wurden, sind der SNAP-Test (SNAP® Foal IgG Test Kit (Idexx Laboratories)), das Totalprotein (TP) im Blut und die Immunglobulinbestimmung aus der Differenz von Totalprotein und Albumin (TP-A).

Der semiquantitative SNAP-Test zählt zu den ELISA-basierten Schnell-Testverfahren (Metzger et al., 2006). Die Ergebnisse des SNAP-Tests sind in anderen Studien zu 64 % mit denen der radialen Immundiffusion und zu 74 % mit der Elektrophorese vergleichbar (Kummer et al., 2018; Pusterla et al., 2002). Da dieser Test einfach und schnell durchführbar ist, wird er bereits häufig in der Diagnostik verwendet.

Auch die Messung des Gesamtproteins im Blutserum kann für die Diagnostik des fehlerhaften passiven Transfers (FPT) beim Fohlen genutzt werden (Hurcombe et al., 2012; Tyler-McGowan et al., 1997). Bei bovinen Neonaten wird die Bestimmung des Gesamtproteingehalts zur Einschätzung der Antikörpersversorgung routinemäßig genutzt, da sie schnell, einfach und kostengünstig ist (Biswal et al., 1993). Während eine Studie die Bestimmung des Gesamtproteins beim Fohlen mittels Refraktometer zwar als mäßig zuverlässig, jedoch als nützlich ansieht (Sedlinská et al., 2005), schätzt eine andere Studie, die ebenfalls die radiale Immundiffusion als Referenzmethode nutzte, die Bestimmung des Gesamtproteins nicht als eine sinnvolle Methode zur Detektion des FPT ein (Rumbaugh et al., 1978).

Weiterhin wurde untersucht, ob die aus der Differenz zwischen Gesamtprotein und Albumin berechnete Konzentration der Gesamtglobuline eine zuverlässigere Diagnostik des FTP zulässt. Verglichen wurde diese Methode mit der durch Elektrophorese gemessenen Gammaglobulin-Fraktion. Es konnten Cut-Off-Werte mit einer Sensitivität von ≥ 90 % für das Gesamtglobulin in den Bereichen < 2 g/l, < 4 g/l und < 8 g/l ermittelt werden, so dass diese Methode vielversprechend für die Ermittlung eines fehlerhaften passiven Transfers erscheint (Fouché et al., 2014).

Mit den eigenen Untersuchungen konnten der SNAP-Test, das Totalprotein und die Berechnung der Immunglobuline aus der Differenz von Totalprotein und Albumin (TP-A) untersucht werden, um das Testverfahren mit der höchsten Sensitivität und

Spezifität für unterversorgte und ausreichend versorgte Fohlen zu finden. Wie bereits dargestellt existieren einige Studien, welche die einzelnen Testverfahren untersucht haben, jedoch untersucht keine dieser Studien die drei Testverfahren an denselben Proben, so dass durch die vorliegende Untersuchung eine bessere Vergleichbarkeit der Testverfahren erzielt werden sollte.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Schnellmethoden benötigt werden, um eine Unterversorgung mit kolostralen Antikörpern schnell zu detektieren, möglichst bevor es aufgrund des Mangels zu einer Infektion des Fohlens gekommen ist.

4.1.3 Stellenwert der Plasmatransfusion in der equinen Neonatologie

Die Aufnahme der Immunglobuline aus dem Kolostrum erfolgt über Pinozytose im Intestinum des Fohlens. Die Epithelzellen, durch welche eine Aufnahme der Immunglobuline erfolgen kann, werden innerhalb von 38 Stunden durch mature Darmzellen ersetzt, welche keine Passage von Makromolekülen mehr zulassen (Jeffcott, 1975). Dieser Absorptionsstillstand wird als „closure“ bezeichnet. Somit ist die Aufnahme von kolostralen Immunglobulinen zeitlich begrenzt und findet vor allem innerhalb der ersten 18 bis 24 Lebensstunden des Fohlens statt (Bostedt, 2011). Nach Jeffcott et al. (1974) nimmt die Aufnahme von Immunglobulinen durch das Intestinum in kurzer Zeit so sehr ab, dass diese bereits nach 12 Lebensstunden nahezu nicht mehr möglich ist. Wird nicht genügend Kolostrum von guter Qualität von einem Fohlen aufgenommen, spricht man von einem FPT. Gründe für einen FPT können eine mangelhafte Kolostrumaufnahme, eine Aufnahme von Kolostrum schlechter Qualität oder eine ungenügende Absorption der kolostralen Immunglobuline sein (Giguère & Polkes, 2005). Nach 18 bis 24 Stunden sollte die Serum-IgG-Konzentration überprüft werden. Liegt dann eine Konzentration von <4 g/l vor, besteht ein vollständiger FPT, während bei Konzentrationen zwischen $4 - 8$ g/l ein partieller FPT besteht (Koterba et al., 1985; Tyler-McGowan et al., 1997). Serum-IgG-Konzentrationen von >8 g/l werden als ausreichend angesehen (Raidal, 1996). Liegt ein FPT zu einem Zeitpunkt nach 18 bis 24 Stunden vor, ist die einzig sinnvolle Behandlungsmethode eine Plasmatransfusion (Crawford et al., 1978; Francesca et al., 2017; Rumbaugh et al., 1979). Durch diese werden über Plasma von adulten Spenderpferden dem neonatalen

Fohlen Immunglobuline substituiert und so die Immunabwehr des Fohlens gewährleistet. So erfolgt die Behandlung der HGG beim neonatalen Fohlen durch die Plasmatransfusion, so dass mögliche Sekundärinfektionen, die sich aus dieser entwickeln können, vermieden werden.

4.1.4 Notwendigkeit der Evaluierung der Plasmatransfusion

Es existieren einige Studien zur Effektivität einer Plasmatransfusion beim Fohlen, aber nur wenige beschreiben den tatsächlichen Verlauf der Serum-IgG-Konzentration nach der Transfusion. Eine Konzentration von 24 g/l IgG in der Transfusion soll zu einem durchschnittlichen Anstieg der Serum-IgG-Konzentration von 400 – 800 mg/dl führen (Giguère & Polkes, 2005). In der bestehenden Literatur wird deutlich, dass der Anstieg sehr variabel ausfallen kann. So benennt eine Studie die durchschnittliche Serum-IgG-Konzentration nach einer Plasmatransfusion mit 1027 ± 400 mg/dl (Francesca et al., 2017). Aufgrund dieser variablen Reaktion der Fohlen auf eine Plasmatransfusion ist es notwendig, weitere Studien zum Verlauf der Serum-IgG-Konzentration und zur benötigten IgG-Konzentration einer Plasmatransfusion durchzuführen. Außerdem wird in der bestehenden Literatur nicht beschrieben, wie viele Fohlen nicht mit einem zu erwartenden Anstieg auf eine Plasmatransfusion reagieren. Es ist sehr wichtig, auch diesen Zustand zu beschreiben, um die Notwendigkeit einer Nachmessung und Kontrolle des Erfolgs der Plasmatransfusion zu rechtfertigen. Weiterhin existieren in der vorhandenen Literatur nach Wissen der Autoren keine Empfehlungen, die einen exakten Zeitpunkt einer Nachmessung der Serum-IgG-Konzentration definieren. In den existierenden Studien werden Zeitpunkte von 24 Stunden bis zu drei Tagen nach einer erfolgten Transfusion gewählt (Francesca et al., 2017; McClure et al., 2001; McTaggart et al., 2005). Der Zeitpunkt von 24 Stunden nach der Transfusion erscheint sinnvoll, da die Umverteilung in den extravaskulären Raum hauptsächlich in diesem Zeitraum stattfindet (White, 1989).

Die Festlegung eines optimalen Zeitpunktes zur Nachmessung ist wichtig, da dieser über die Notwendigkeit einer weiteren Transfusion entscheidet. Ist der Zeitpunkt zu früh oder zu spät gewählt, werden Fohlen, die eine ausreichende Versorgung zeigen, eventuell erneut transfundiert oder aber Fohlen, die noch nicht ausreichend versorgt

sind, erhalten keine Folgetransfusion. In dieser Studie sollte zusätzlich überprüft werden, wie sich die Serum-IgG-Konzentration zwischen einer und 24 Stunden nach der Plasmatransfusion verändert. Der Zeitpunkt von einer Stunde nach der Transfusion wurde gewählt, um festzustellen, ob zu diesem Zeitpunkt bereits eine Aussage über den Transfusionserfolg zu treffen ist. So könnten Fohlen, die nicht mit einem adäquaten Anstieg auf eine Plasmatransfusion reagieren, früh erneut transfundiert werden.

4.2 Diskussion der Methode

4.2.1 Literaturübersicht

Als Literaturübersicht wurde eine im Jahr 2019 publizierte Veröffentlichung verwendet, welche die vorhandene Literatur beschreibt und zusammenfasst. Trotz des Alters der Publikation fasst diese weiterhin die aktuelle Studienlage ausreichend zusammen und ist als Übersichtsarbeit gut geeignet. Kürzlich veröffentlichte Publikationen greifen spezifische Aspekte der Thematik auf, zeigen aber keine für diese Studie relevante Veränderungen der geltenden Grundsätze.

Eine kürzlich erschienene Veröffentlichung erweiterte die Untersuchungen der Einflussfaktoren auf die IgG-Konzentration im Blut von Fohlen um die Supplementation von Kolostrum nach der Geburt (Nissen et al., 2022). Die Autoren konnten feststellen, dass eine Zuführung von Kolostrum mittels Flasche keinen signifikanten Einfluss auf die IgG-Konzentration im Blut der Fohlen hat. Vielmehr führt diese zu einer verzögerten eigenständigen Kolostrumaufnahme des Fohlens am Euter der Stute. Auch das Vorliegen einer Dystokie wurde im Hinblick auf den Einfluss auf die IgG-Konzentration untersucht (Aoki et al., 2020). Es konnte festgestellt werden, dass die IgG-Konzentration im Kolostrum keinen signifikanten Unterschied zwischen Kaltblut-Stuten, die in einer Eutokie oder in einer Dystokie abfohlten, aufweist. Jedoch war die IgG-Konzentration in Fohlen, die durch eine Dystokie zur Welt kamen signifikant niedriger.

Auch zu der Qualitätsbeurteilung des Kolostrums existieren aktuelle Studien. Rampacci et al. (2022) beschreiben, dass auch das optische Refraktometer Potenzial

hat, zuverlässig zwischen guter und schlechter Kolostrum-Qualität zu unterscheiden. Dies bietet ein weiteres diagnostisches Mittel für die Bestimmung der Kolostrum-Qualität neben dem Einsatz des Brix-Refraktometers, welches zuverlässig die IgG-Konzentration im Kolostrum bestimmt (McCue, 2021).

In der Literaturübersicht wurden Studien zur Plasmatransfusion beim equinen Neonaten nicht berücksichtigt, da diese zunächst einen Überblick über die HGG und Nachweisverfahren eines FPT geben soll. Die bestehende Literatur zur Plasmatransfusion ist in der Einleitung der dritten Veröffentlichung berücksichtigt und in der Diskussion dieser Veröffentlichung mit den eigenen Ergebnissen diskutiert.

4.2.2 Studienpopulation

In wissenschaftlichen Studien werden hohe Ansprüche an die Studienpopulation gefordert. Es sollte eine hohe Anzahl an Probanden und eine große Übereinstimmung in bestimmten Merkmalen sowie in den Einschluss- und Ausschlusskriterien vorliegen. Betrachtet man die erste Studie, so wird deutlich, dass mit 148 Proben von 119 Fohlen eine hohe Anzahl von Probanden einbezogen werden konnte. Diese Anzahl von Fohlen ist höher als in den meisten anderen vergleichbaren Studien, wobei auch Studien existieren, die eine Untersuchung an mehr Proben durchführen (Elsohaby et al., 2019; McClure et al., 2003; Tscheschlok et al., 2017). Die Rasseverteilung war inhomogen. So wurden 59 Warmblüter (49.6%), 18 Ponys (15.1%), 13 Vollblüter (10.9%), 5 Quarter (4.2%), 4 Kaltblüter (3.4%), und 20 Pferde anderer Rassen (16.8%) in die Studie einbezogen. Da die Definition einer HGG mit einer Serum-IgG-Konzentration von <800 mg/dl bisher als rasseunabhängig gilt, hat die inhomogene Rasseverteilung keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Studie und stellt die typische Pferdrassenverteilung in Mitteldeutschland dar (Aurich & Aurich, 2006). Das Alter der Fohlen betrug zwischen einer Stunde und sechs Tagen. Die meisten Fohlen zeigten ein Alter zwischen einem (n = 102) und zwei Tagen (n = 26). Dieses Alter ist repräsentativ für equine Neonaten, bei denen eine HGG diagnostiziert wird (Graßl et al., 2017). Wichtig war es, eine hohe Probenanzahl aus dem niedrigen Messbereich zu nutzen, um die bestmögliche Methode für die Diagnose eines FPT und damit einer

HGG zu finden. Aus diesem Grund ist das Alter der Fohlen von einem Lebenstag überdurchschnittlich häufig in diese Studie einbezogen.

In die zweite Studie wurden 23 Fohlen einbezogen, die an einer HGG erkrankt waren. Auch hier war die Rasseverteilung inhomogen. Es wurden 16 Warmblüter (69,6%), zwei Vollblüter (8,7%), zwei Quarter (8,7%), zwei Ponys (8,7%) und ein Kaltblut (4,3%) einbezogen. Das Alter der Fohlen betrug zwischen 24 und 72 Stunden. Dieses Alter ist geeignet um eine HGG zu diagnostizieren und zu behandeln. Die Fohlen wiesen verschiedene weitere Erkrankungen auf, welche die typischen neonatalen Erkrankungen der ersten Lebenstage repräsentieren (Graßl et al., 2017). Dadurch sind die Ergebnisse auf die tierärztliche Praxis übertragbar.

4.2.3 Kontrollproben und Testevaluierung

Es wurde ein quantitativer ELISA als Referenzmethode verwendet, da dieser sehr sensitiv ist, absolute Werte liefert und eine hohe Reproduzierbarkeit besitzt. Dieser ist innerhalb eines Tages auswertbar und wurde bereits in der equinen Neonatologie als Goldstandard genutzt (Erhard et al., 2001). Außerdem konnte eine gute Korrelation mit der RID festgestellt werden. Für das Testverfahren wurde eine Standardkurve unter Verwendung des ChromPure Horse IgG Standards der Firma ImmunoResearch Laboratories, INC. erstellt. Die Verdünnung des Standards für die Standardkurve erfolgte durch ein Ansetzen in PBS. Zur Ermittlung der optimalen Probenverdünnung wurden ausgewählte Proben der Fohlen verwendet und mit PBS in Verdünnungsstufen angesetzt.

Für eine vorläufige Evaluierung des ELISAs wurden sechs Proben aus verschiedenen Messbereichen in ein externes Labor zur Untersuchung eingeschickt (LABOKLIN GMBH & CO.KG, Bad Kissingen, Deutschland). Hierfür wurden je zwei Proben aus dem niedrigen, mittleren und hohen Messbereich ausgewählt. Die Proben wurden mittels Serumelektrophorese gemessen und anschließend mit den durch den ELISA gemessenen Werten verglichen. Es konnte eine Korrelation bzw. Übereinstimmung zwischen beiden Messmethoden festgestellt werden (Anhang). Außerdem fand ein Vergleich der Ergebnisse der ELISA-Messung mit einem quantitativen ELISA (Bio-X

Diagnostics S.A., Rochefort, Belgien) von 28 ausgewählten Proben statt, die eine Übereinstimmung der Ergebnisse zeigte (Anhang). Weiterhin wurde im Vergleich zur bestehenden Literatur festgestellt, dass die gemessenen Werte im bekannten Nachweisbereich liegen und so die Eignung des ELISAs als Goldstandard bestätigt (LeBlanc, 1990; McGuire et al., 1977; Morris et al., 1985).

Zur Evaluation wurden außerdem fünf Vortests durchgeführt. In diesen Tests wurden neben der Standardkurve sieben Proben mitgeführt, deren Konzentration einen großen Bereich der Standardkurve abdecken. Diese Proben wurden durch Verschneiden einer biologischen Probe mit hohem IgG-Gehalt mit einer biologischen Probe mit niedrigem IgG-Gehalt erzeugt. Außerdem wurden die 95 %-Konfidenzintervalle für die Messungen der einzelnen Standards bestimmt. Weiterhin wurden Inter- und Intra-Assays erstellt. Der Inter-Assay dient zur Kontrolle der Reproduzierbarkeit des Tests an unterschiedlichen Tagen der Messungen (Reed et al., 2002). Dafür werden Replikate gleicher Proben in verschiedenen Assays zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Die Ergebnisse sollten an verschiedenen Messtagen konstant sein. Die Bestimmung erfolgte über zwei Proben, die konstant in jeder Testplatte mitgeführt wurden. Die Inter-Assay-Variationskoeffizienten für Proben aus dem niedrigen Messbereich (<120 mg/dl) und dem hohen Messbereich (>500 mg/dl) betragen 6,4 % bzw. 5,6 % (Anhang). Die Erstellung eines Intra-Assay dient der Überprüfung der Reproduzierbarkeit zwischen den einzelnen Wells des ELISAs, so dass die Sicherheit besteht, dass alle Wells vergleichbare Ergebnisse liefern (Reed et al., 2002). Somit wurden Replikate gleicher Proben im selben Assay an verschiedenen Stellen platziert. Die jeweiligen Intra-Assay-Variationskoeffizienten für Proben aus dem niedrigen und hohen Messbereich lagen bei 13,6 % und 4,6 % (Anhang).

Damit zeigen sowohl der Intra-Assay als auch der Inter-Assay nur sehr geringe Schwankungen, so dass die Eignung des Testes bestätigt werden konnte.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden bereits ausführlich in den Veröffentlichungen diskutiert, daher sollen hier nur einige Aspekte aufgegriffen und übergreifend dargestellt werden.

4.3.1 Vergleich der drei Testmethoden

Allgemein bestanden gute Korrelationen zwischen den verschiedenen Testverfahren und dem ELISA, wobei die mit dem SNAP-Test deutlich höher war ($\rho = 0.79$, $p < 0.0001$) als die mit TP-A ($\rho = 0.66$, $p < 0.0001$) und TP ($\rho = 0.60$, $p < 0.0001$).

Eine hohe Sensitivität des SNAP-Tests für IgG-Konzentrationen von ≤ 400 mg/dl und ≤ 800 mg/dl wurde bereits von anderen Autoren beschrieben (Metzger et al., 2006). Methodisch ist jedoch anzumerken, dass diese Studie, die den SNAP-Test an hospitalisierten und kranken Fohlen evaluiert hat, sich lediglich auf die Untersuchung von nur 67 Fohlen stützt (Metzger et al., 2006). Eine weitere Studie, die eine hohe Sensitivität des SNAP-Tests beschreibt, bezieht nur Fohlen in einem Alter von 24 – 72 Stunden post natum ein (McClure et al., 2003).

In dem Messbereich von < 800 mg/dl zeigt der SNAP-Test eine geringere Sensitivität (64.5 %) als in anderen zuvor durchgeführten Studien (Davis & Giguère, 2005; McClure et al., 2003). Durch die geringe Sensitivität entstehen häufiger falsch negative Ergebnisse, so dass ausreichend mit IgG versorgte Fohlen eine Plasmatransfusion erhalten, obwohl diese nicht notwendig wäre. Dies ist nicht ungefährlich, da durch eine Plasmatransfusion auch unerwünschte Reaktionen auf die Transfusion entstehen können und zusätzlich werden unnötige Kosten verursacht (Hardefeldt et al., 2010). Im Bereich von < 400 mg/dl zeigt der SNAP-Test eine deutlich höhere Sensitivität (89,4%) und auch im Vergleich zu anderen Studien eine hohe Spezifität (83%), so dass unterversorgte Fohlen sicher erkannt werden können. Somit ist der SNAP-Test geeignet, um eine HGG zu diagnostizieren. Dies ist vor allem für die Praxis ein wertvolles Ergebnis, da der SNAP-Test direkt vor Ort durchführbar ist und innerhalb von 10 Minuten eine Aussage über den IgG-Status des Fohlens gibt.

Im Vergleich dazu konnten bei der Bestimmung des TPs keine aussagekräftigen Werte erzielt werden. Die Schwierigkeit hierbei liegt vor allem in der Festlegung geeigneter Cut-Off-Werte, die zu einer klinisch brauchbaren Sensitivität und Spezifität für IgG-Konzentrationen von ≥ 800 mg/dl oder < 800 mg/dl bzw. < 400 mg/dl führen. Der Grund könnte darin liegen, dass die TP-Konzentration im Blut auch von anderen Faktoren beeinflusst sein kann. So spiegelt sie nicht nur die Immunglobulinkonzentration und vor allem das IgG wider, sondern besteht auch zu ca. 50% aus Albumin (Knottenbelt

et al., 2004). Außerdem können die Werte durch den Hydratationsstatus des Fohlens beeinflusst sein (Roscher, 2011). Die Einschränkungen des Testverfahrens sind bedauerlich, da dieses Verfahren einfach durchzuführen ist und schnelle Ergebnisse liefert. Andere Autoren geben jedoch an, dass das TP eine geeignete Testmethode sein kann, wenn höhere Cut-off-Werte gewählt werden, die zu einer höheren Sensitivität und geringeren Spezifität führen (Elsohaby et al., 2019; Metzger et al., 2006). Der Kompromiss zwischen Sensitivität und Spezifität wird als vernünftig angesehen, da eine nicht erkannte HGG zu schweren klinischen Infektionen führen kann und unnötige Behandlungen kein besonderes Risiko für die Fohlen darstellen.

Die Verwendung des TP-A zeigt in anderen Studien gute Ergebnisse. So konnten Tscheschlok et al. (2017) an 360 Serumproben von 60 Fohlen feststellen, dass bei der Diagnose des FPT die Sensitivität und die Spezifität der Gesamtglobulinkonzentration vergleichbar mit denen anderer verwendbarer Tests sind (Zinksulfatfärbungstest, Glutaraldehydkoagulationstest und SNAP-Test). Die Methode TP-A zeigt auch in der vorliegenden Untersuchung gute Ergebnisse. Obwohl die Ergebnisse der Sensitivität und Spezifität für eine IgG-Konzentration von 800 mg/dl bei einem Cut-Off-Wert von 27 g/l (Sensitivität: 74,5%, Spezifität: 84,5%) und <400 mg/dl bei einem Cut-Off-Wert von 24 g/l (Sensitivität: 75,8%, Spezifität: 78,1%) geringer waren als beschrieben (Fouché et al., 2014; Tscheschlok et al., 2017), eignen sie sich für die Diagnose einer FPT. Dies ist durch die damit verbundene hohe Sensitivität gerechtfertigt.

Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte festgestellt werden, dass der SNAP-Test, die TP- und die TP-A-Methode im Vergleich zum ELISA als Referenzmethode bei der Bestimmung der IgG-Konzentration ≥ 800 mg/dl ähnlich gute Ergebnisse liefern. Um IgG-Konzentrationen von <400 mg/dl nachzuweisen, zeigen der SNAP-Test und die TP-A-Methode bessere Ergebnisse als die alleinige Bestimmung des TP.

Die ähnlichen Ergebnisse im Bereich einer IgG-Konzentration von 800 mg/dl lassen sich nur derzeit nur schwer interpretieren, da eine geringe Anzahl von Proben aus dem hohen Messbereich vorlag. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Proben von Fohlen gewonnen wurden, die in einer Klinik vorgestellt wurden, und daher nur wenige Proben von Fohlen vorlagen, die eine ausreichende Aufnahme von Immunglobulin G aus dem Kolostrum der Stute aufwiesen. Darüber hinaus wurde im Studiendesign Wert

daraufgelegt, viele Proben mit niedrigen Werten zu benutzen, da die Eignung der Tests vor allem im Hinblick auf den Nachweis eines FPT untersucht werden sollte.

4.3.2 Überprüfung der Plasmatransfusion

Es konnte gezeigt werden, dass die benötigte IgG-Menge zu den Zeitpunkten eine Stunde und 24 Stunden nach der Plasmatransfusion unterschiedlich war. Um eine Steigerung der Serum-IgG-Konzentration von 1 mg/dl zu erzielen, wurde eine Stunde nach der Transfusion im Mittel 293,4 mg IgG benötigt und 24 Stunden nach der Transfusion 164,5 mg. Somit konnte durch 1 mg transfundiertes IgG ein Anstieg der Serum-IgG-Konzentration von 0,03 mg/dl eine Stunde nach der Transfusion und 0,05 mg/dl 24 Stunden nach der Transfusion erzielt werden. Diese Werte machen deutlich, dass das Transfusionsergebnis 24 Stunden nach der Transfusion kontrolliert werden sollte. Dies ist auch sinnvoll bei Fohlen, die schon eine Stunde nach der Transfusion einen Anstieg zeigen, um den tatsächlichen Anstieg der Serum-IgG-Konzentration zu detektieren. Francesca et al. (2017) stellten fest, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der Serum-IgG-Konzentration zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 72 Stunden nach der Plasmatransfusion besteht, so dass die Kontrolle der Plasmatransfusion nicht später als 24 Stunden nach der Transfusion stattfinden sollte. Auffällig war die große Variabilität im Anstieg der Serum-IgG-Konzentration der einzelnen Fohlen und zwar sowohl bei Fohlen, die ausschließlich an einer HGG erkrankt waren als auch bei Fohlen, die noch weitere Erkrankungen zeigten. Diese Variabilität bestätigt frühere Studien, die ebenfalls einen wechselhaften Anstieg der Serum-IgG-Konzentration beschrieben haben (Francesca et al., 2017; McClure et al., 2001; Wilkins & Dewan-Mix, 1994). In keiner der vorhandenen Studien wird beschrieben, dass ein Fohlen nach Erhalt einer Plasmatransfusion keinen Anstieg der Serum-IgG-Konzentration zeigte. Die Individualität des Anstiegs ist groß, so dass sich die Serum-IgG-Konzentration im Blut der Fohlen nach der Transfusion teilweise nur minimal von den Ausgangswerten unterscheidet. Francesca et al. (2017) nennen beispielsweise einen Anstieg der Serum-IgG-Konzentration von 647 ± 428 mg/dl, während McClure et al. (2001) einen durchschnittlichen Anstieg der IgG-Konzentration im Serum von 351 ± 146 mg/dl ermittelten. Die hohe Standardabweichung zeigt, dass

in diesen Studien auch geringe Anstiege vorlagen. In der vorliegenden Untersuchung konnte bei 22% der Fohlen kein Anstieg der Serum-IgG-Konzentration nach der Plasmatransfusion festgestellt werden. Mögliche Gründe dafür können vielfältig sein. So ist es möglich, dass die Aufnahme des IgGs von anderen Erkrankungen beeinflusst sein kann, oder dass erkrankte Fohlen die Immunglobuline nach der Transfusion schneller verbrauchen. Weiterhin kann es zu einer Komplexbildung des transfundierten IgGs und dem im Blut vorhandenen Antikörpern kommen, die dann abgebaut werden (Knottenbelt et al., 2004). Um die Ursachen des fehlenden Transfusionserfolgs zu detektieren, sind weitere Untersuchungen notwendig. Da betroffene Fohlen auch bereits zu dem Zeitpunkt von einer Stunde nach der Transfusion keinen Anstieg der Serum-IgG-Konzentration zeigten, kann zu diesem Zeitpunkt eine Kontrollprobe genutzt werden, um die Fohlen, die nicht auf die Transfusion reagieren, frühzeitig zu erkennen. Diese frühzeitige Erkennung resultiert in einer frühen Folgetransfusion, so dass eine anhaltende HGG deutlich eher therapiert werden könnte.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Kontrolluntersuchung der Serum-IgG-Konzentration von enormer Wichtigkeit ist. Es lässt sich nicht vorhersagen, wie die Fohlen auf die Transfusion ansprechen, und wie hoch die transfundierte Menge IgG für eine ausreichende Versorgung sein muss. Die vorliegenden Werte geben zwar eine Orientierung, müssen aber aufgrund des individuellen Ansprechens der Fohlen in jedem Fall kontrolliert werden.

4.4 Ausblick

Die Bestimmung der Serum-IgG-Konzentration kann durch verschiedene Testverfahren durchgeführt werden. In der vorliegenden Untersuchung konnte gezeigt werden, welche schnell durchführbaren Verfahren sich besonders eignen. Dies ist wichtig, da eine schnelle und sichere Diagnostik gewährleistet werden sollte, um im Falle einer Minderversorgung zügig reagieren zu können. Dieser Studie sollten sich weitere Untersuchungen anschließen, um darzustellen, ob eine Kombination der verschiedenen Messmethoden noch sensitivere und spezifischere Ergebnisse liefern

kann. Weiterhin sollten die Ergebnisse an einer größeren Anzahl von ausreichend versorgten Fohlen (Serum-IgG-Konzentration von >800 mg/dl) evaluiert werden.

Im Hinblick auf die Untersuchungen zu der Plasmatransfusion sind ebenfalls Folgestudien sinnvoll, um die Variabilität des Anstiegs und mögliche Ursachen für ein Therapieversagen der Plasmatransfusion zu definieren. Dazu wäre es sinnvoll, die Fohlen nach verschiedenen Kriterien in unterschiedliche Klassen einzuteilen. Mögliche Faktoren, die dabei berücksichtigt werden können, sind beispielsweise die Rasse, das Gewicht oder die weitere Erkrankung der Fohlen. Weiterhin könnte die Einteilung durch Laborparameter ergänzt werden.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, das bestmögliche, schnell durchführbare Testverfahren, um eine HGG beim neonatalen Fohlen zu diagnostizieren, zu bestimmen und den Verlauf der Serum-IgG-Konzentration nach einer Plasmatransfusion darzulegen. Dazu wurden zwei unterschiedliche Studien durchgeführt.

In die erste Studie wurden 119 Fohlen in einem Alter von ein bis sechs Tagen einbezogen. Diese befasste sich mit der Evaluierung und Bewertung von drei schnell durchführbaren Testverfahren zur Diagnose einer HGG. Untersucht wurden der SNAP-Test, die Totalprotein-Bestimmung und die Bestimmung von TP-A. Die Ergebnisse wurden mit einem in-house entwickelten quantitativen ELISA als Referenzmethode verglichen. Die zweite Studie untersuchte den Verlauf der Serum-IgG-Konzentration nach einer Plasmatransfusion von neugeborenen Fohlen. Dazu wurden 23 Fohlen untersucht, die ein Alter von 24 bis 72 Stunden aufwiesen und mit einer Plasmatransfusion behandelt wurden. Die Serum-IgG-Konzentrationen wurden zu den Zeitpunkten vor der Transfusion, eine Stunde und 24 Stunden nach der Transfusion gemessen.

Folgende relevante Ergebnisse konnten in den beiden Studien erzielt werden:

- Die erste Studie zeigte, dass der SNAP-Test, die Bestimmung des TPs und die Berechnung von TP-A im Vergleich zum ELISA als Referenzmethode bei der Bestimmung der IgG-Konzentration ≥ 800 mg/dl ähnlich gute Werte lieferten. Auf der Grundlage der 95%igen Konfidenzintervalle scheinen der SNAP-Test und die Berechnung von TP-A ähnlich gut, aber besser als die Bestimmung des TPs für die Erkennung von IgG-Konzentrationen < 400 mg/dl zu funktionieren.
- In der zweiten Studie konnte festgestellt werden, dass die Transfusion von 1 mg IgG eine durchschnittliche Erhöhung des Serum-IgG-Spiegels von 0,03 mg/dl (0.001-0.268 mg/dl) bewirkte. Führte man die Kontrolle des Serum-IgG-Spiegels nach 24 Stunden durch, verursachte die gleiche Menge einen Anstieg

von 0,05 mg/dl (0.002-0.537 mg/dl). Ca. 22 % der Fohlen zeigten keinen messbaren Anstieg der Serum-IgG-Konzentration nach der Plasmatransfusion.

Somit konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen festgestellt werden, welches das geeignetste Testverfahren für eine schnelle Diagnose der Hypogammaglobulinämie ist. Weiterhin wurde gezeigt, dass neonatale Fohlen sehr individuell auf eine Plasmatransfusion reagieren und eine Folgemessung nach einer Plasmatransfusion unbedingt notwendig ist.

6 Summary

The aim of this research work was to determine the best possible, rapid test procedure to diagnose HGG in the neonatal foal and to evaluate the course of serum IgG concentration after plasma transfusion. Two different studies were conducted for this purpose.

The first study involved 119 foals between one and six days of age. The study evaluated and assessed three rapid tests for the diagnosis of hypogammaglobulinemia (HGG). The SNAP test, the total protein determination and the determination of TP-A were investigated. The results were compared with an in-house developed quantitative ELISA as a reference method. The second study investigated the course of serum IgG concentration after plasma transfusion of newborn foals. For this purpose, 23 foals with HGG were examined at an age of 24 to 72 hours and were treated with a plasma transfusion. Serum IgG concentrations were measured before transfusion and one hour as well as 24 hours after transfusion.

The following relevant results were obtained in the two studies:

- The first study showed that the SNAP test, the determination of TP and the calculation of TP-A provided similarly good values compared to ELISA as the reference method in the determination of IgG concentration ≥ 800 mg/dl. Based on the 95% confidence intervals, the SNAP test and the calculation of TP-A appear to perform similarly well but better than the determination of TP for the detection of IgG concentrations < 400 mg/dl.
- In the second study, it was found that transfusion of 1 mg IgG caused an average increase in serum IgG level of 0.03 mg/dl (0.001-0.268 mg/dl). When the serum IgG level was controlled after 24 hours, the same amount caused an increase of 0.05 mg/dl (0.002-0.537 mg/dl). Approximately 22% of the foals showed no measurable increase in serum IgG concentration after plasma transfusion.

Based on these study results it was possible to determine which is the most suitable test for a rapid diagnosis of hypogammaglobulinemia. Furthermore, it was shown that neonatal foals react very individually to a plasma transfusion and that a follow-up measurement after a plasma transfusion is absolutely necessary.

7 Literaturverzeichnis

Aoki, T., Chiba, A., Itoh, M., Nambo, Y., Yamagishi, N., Shibano, K. I., Cheong, S.H., 2020: Colostral and foal serum immunoglobulin g levels and associations with perinatal abnormalities in heavy draft horses in japan. *Journal of Equine Science*, 31(2), 29–34.

Aurich, J., Aurich, C., 2006: Developments in european horse breeding and consequences for veterinarians in equine reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 41(4), 275–279.

Biswal, S. P., Dutta, N. K., Mishra, P. R., 1993: Estimation of total serum-protein and immunoglobulin level in neonatal calves. *Indian Veterinary Journal*, 70(1), 7–9.

Bostedt, H., 2011: Einige physiologische Aspekte zum Status des equinen Neonaten. *Veterinär Spiegel*, 21(4), 186–193.

Christmann, U., 2021: Plasma therapy in the foal. In: *Equine Reproductive Procedures*. Dascanio, J. J., McCue, P. M., (Hrsg.). Wiley-Blackwell, New Jersey, 707–709.

Crawford, T.B., McGuire, T.C., Hallowell, A.L., Macomber, L.E., 1978: Failure of colostral antibody transfer in foals: its effect, diagnosis and treatment. *Proceedings Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 23, 265–274.

Davis, R., Giguère, S., 2005: Evaluation of five commercially available assays and measurement of serum total protein concentration via refractometry for the diagnosis of failure of passive transfer of immunity in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227(10), 1640–1645.

Elsohaby, I., Riley, C. B., McClure, J. T., 2019: Usefulness of digital and optical refractometers for the diagnosis of failure of transfer of passive immunity in neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*, 51(4), 451–457.

Erhard, M. H., Luft, C., Remler, H. P., Stangassinger, M., 2001: Assessment of colostral transfer and systemic availability of immunoglobulin G in new-born foals using a newly developed enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) system. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 85(5–6), 164–173.

Fouché, N., Graubner, C., Howard, J., 2014: Correlation between serum total globulins and gamma globulins and their use to diagnose failure of passive transfer in foals. *The Veterinary Journal*, 202(2), 384–386.

Francesca, F., Jole, M., Aliai, L., Chiara, C., Carolina, C., 2017: Efficacy and safety of a commercial fresh-frozen hyperimmune plasma in foals with failure of passive transfer of immunity. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48, 174-181.

Giguère, S., Polkes, A. C., 2005: Immunologic disorders in neonatal foals. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 21(2), 241–272.

Graßl, M., Ulrich, T., Wehrend, A., 2017: Inzidenz und Letalität häufiger neonataler Erkrankungen beim Fohlen während der ersten 10 Tage post natum in einer Veterinärklinik. *Tierärztliche Praxis Ausgabe G: Grosstiere - Nutztiere*, 45(6), 357–361.

Hardefeldt, L. Y., Keuler, N., Peek, S. F., 2010: Incidence of transfusion reactions to commercial equine plasma. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20(4), 421–425.

Hurcombe, S. D. A., Matthews, A. L., Scott, V. H. L., Williams, J. M., Kohn, C. W., Toribio, R. E., 2012: Serum protein concentrations as predictors of serum immunoglobulin G concentration in neonatal foals. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 22(5), 573–579.

Jeffcott, L. B., 1972: Passive immunity and its transfer with special reference to the horse. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 47(4), 439–464.

Jeffcott, L. B., 1974: Studies on passive immunity in the foals. The absorption of 1251-labelled PVP (polyvinyl pyrrolidone) by the neonatal intestine. *Journal of Comparative Pathology*, 84, 279–289.

Jeffcott, L. B., 1975: The transfer of passive immunity to the foal and its relation to immune status after birth. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23, 727–733.

Knottenbelt, D. C., Holdstock, N., Madigan, J. E., 2004: Procedures and diagnostic aids. In: *Equine Neonatal Medicine and Surgery*. Knottenbelt, D.C., Holdstock, N., Madigan, J.E. (Hrsg.) Elsevier Health Sciences, Philadelphia, 1, 396–399.

Koterba, A. M., Brewer, B., Drummond, W. H., 1985: Prevention and control of infection. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 1(1), 41–50.

Kummer, L. L., Govaere, J., Egri, B., 2018: Comparison of the reliability of SNAP foal Ig test, gamma-check e test, refractometry and electrophoresis for determining the immune status of newborn foals in the first hours of life. *Acta Veterinaria Hungarica*, 66(4), 573–586.

LeBlanc, M. M., 1990: Immunologic considerations. *Equine Clinical Neonatology*, 275–295.

McClure, J. T., DeLuca, J. L., Lunn, D. P., Miller, J., 2001: Evaluation of IgG concentration and IgG subisotypes in foals with complete or partial failure of passive transfer after administration of intravenous serum or plasma. *Equine Veterinary Journal*, 33(7), 681–686.

McClure, J. T., Miller, J., DeLuca, J. L., 2003: Comparison of two ELISA screening tests and a non-commercial glutaraldehyde coagulation screening test for the detection of failure of passive transfer in neonatal foals. *Proceedings Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 49, 301–305.

McCue, P. M., 2021: Evaluation of colostrum quality: brix refractometry. *Equine Reproductive Procedures*, 393–394.

McGuire, T. C., Crawford, T. B., Hallowell, A. L., Macomber, L. E., 1977: Failure of colostral immunoglobulin transfer as an explanation for most infections and deaths of neonatal foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 170(11), 1302–1304.

McTaggart, C., Penhale, J., Raidal, S. L., 2005: Effect of plasma transfusion on neutrophil function in healthy and septic foals. *Australian Veterinary Journal*, 83(8), 499–505.

Metzger, N., Hinchcliff, K. W., Hardy, J., Schwarzwald, C. C., Wittum, T., 2006: Usefulness of a commercial equine IgG test and serum protein concentration as indicators of failure of transfer of passive immunity in hospitalized foals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 20(2), 382–387.

Morris, D. D., Meirs, D. A., Merryman, G. S., 1985: Passive transfer failure in horses: incidence and causative factors on a breeding farm. *American Journal of Veterinary Research*, 46(11), 2294–2299.

Nissen, A. L., Schuberth, H.-J., Freise, F., Weber, C., Venner, M., 2022: Postnatal colostrum management and its impact on IgG blood levels of neonatal foals. *Pferdeheilkunde* 38(4), 336–341.

Pusterla, N., Pusterla, J. B., Spier, S. J., Puget, B., Watson, J. L., 2002: Evaluation of the SNAP foal IgG test for the semiquantitative measurement of immunoglobulin G in foals. *The Veterinary Record*, 151(9), 258–260.

Raidal, S. L., 1996: The incidence and consequences of failure of passive transfer of immunity on a thoroughbred breeding farm. *Australian Veterinary Journal*, 73(6), 201–206.

Rampacci, E., Mazzola, K., Beccati, F., Passamonti, F., 2022: Diagnostic characteristics of refractometry cut-off points for the estimation of immunoglobulin G concentration in mare colostrum. *Equine Veterinary Journal*, 1–9.

Reed, G. F., Lynn, F., Meade, B. D., 2002: Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. *Clinical and Vaccine Immunology*, 9(6), 1235–1239.

Roscher K., 2011: Hämatologie und klinische Chemie. In: Fohlenmedizin. Fey, K., Kolm, G. (Hrsg.). Enke Verlag, Stuttgart. 191–192.

Rumbaugh, G. E., Ardans, A. A., Ginno, D., Trommershausen-Smith, A., 1978: Measurement of neonatal equine immunoglobulins for assessment of colostrum immunoglobulin transfer: comparison of single radial immunodiffusion with the zinc sulfate turbidity test, serum electrophoresis, refractometry for total serum protein, and the so. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 172(3), 321–325.

Rumbaugh, G. E., Ardans, Aa., Ginno, D., Trommershausen-Smith, A., 1979: Identification and treatment of colostrum-deficient foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 174(3), 273–276.

Sedlinská, M., Krejčí, J., Vyskočil, M., 2005: Evaluation of field methods for determining immunoglobulins in sucking foals. *Acta Veterinaria Brno*, 74(1), 51–58.

Tscheschlok, L., Venner, M., Howard, J., 2017: Comparison of IgG concentrations by radial immunodiffusion, electrophoretic gamma globulin concentrations and total globulins in neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*, 49(2), 149–154.

Tyler-McGowan, C. M., Hodgson, J. L., Hodgson, D. R., 1997: Failure of passive transfer in foals: incidence and outcome on four studs in New South Wales. *Australian Veterinary Journal*, 75(1), 56–59.

Venner, M., Markus, R., Strutzberg-Minder, K., Nogai, K., Beyerbach, M., Klug, E., 2008: Postpartale Immunglobulin-G-Konzentrationen im equinen Kolostrum mittels ELISA-Methode, Kolostrometrie und Refraktometrie. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 121, 66–72.

Warko, G., & Bostedt, H., 1993: The development of the IgG concentration in the blood serum of newborn foals. *Tierärztliche Praxis*, 21(6), 528–535.

White, S. L., 1989: The use of plasma in foals with failure of passive transfer and/or sepsis. In: *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners*, 35, 215–218.

Wilkins, P. A., Dewan-Mix, S., 1994: Efficacy of intravenous plasma to transfer passive immunity in clinically healthy and clinically ill equine neonates with failure of passive transfer. *The Cornell Veterinarian*, 84(1), 7–14.

8 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich:

„Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Maren Sievert

9 Danksagung

Den letzten Teil dieser Arbeit möchte ich nutzen, um allen Menschen zu danken, die mich bei der Verfassung meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Axel Wehrend für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung bedanken. Danke für das stetige Motivieren, die schnellen Korrekturen und das Vertrauen in meine Arbeit.

Ein großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Schuler für die Unterstützung bei der Erstellung und Auswertung des ELISAs und die stets geduldige Beantwortung aller meiner Fragen. Weiterhin möchte ich dem gesamten RIA-Labor, insbesondere Carmen Schuhmacher-Schmidt, für die Einarbeitung und das Bereitstellen der Arbeitsgeräte und Materialien danken.

Julia Blad-Stahl und Katrin Koslowski möchte ich für die Unterstützung bei der Bearbeitung und beim Messen meiner Proben danken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern der Klinik für Geburtshilfe, Gynäkologie und Andrologie und vor allem bei den Assistenten bedanken, dass ihr stets meine Launen ertragen habt und wir so eine gute Zeit zusammen hatten. Danke vor allem an Lukas Demattio, dass du immer überzeugt davon warst, dass diese Doktorarbeit irgendwann fertig wird.

Den Oestinghausern, der Gang und den Gießenern möchte ich danken, dass ihr so wundervolle Freunde seid. Ohne euch wäre ich sicherlich des Öfteren wirklich verzweifelt.

Danke dir, Jana, dass du so gut Englisch und Computer kannst, mich so sehr unterstützt und bei jedem Tief, das ich hatte, die richtigen Worte gefunden hast. Du bist und bleibst ein Jackpot.

Mein größter Dank gehört meiner Familie. Danke, dass ihr immer da seid, mir soviel ermöglicht habt und immer an mich glaubt. Danke Oma, dass du in den entscheidenden Momenten eine Kerze für mich angezündet hast.

10 Anhang

Tab. 1: Vergleich der Messergebnisse des ELISAs mit der elektrophoretischen Messung (LABOKLIN) von sechs ausgewählten Proben.

Proben Nr.	20	22	26	50	77	83
ELISA (mg/dl)	516	158	1060	1350	704	2630
Elektrophorese (mg/dl)	660	180	1180	2400	450	2190

Tab. 2: Vergleich der Messergebnisse des ELISAs mit einem quantitativen ELISA (Bio-X Diagnostics S.A., Rochefort, Belgien) an 28 ausgewählten Proben.

Nr.	Bio-X (mg/dl)	in-house ELISA (mg/dl)
1	1558	1270
2	523	534
3	568	485
4	736	583
5	1132	1090
6	1147	954
7	<300	271
8	608	807
9	799	788
10	903	103
11	552	713
12	1303	1080
13	909	916
14	850	931
15	568	613
16	983	943
17	<300	269

18	704	605
19	868	780
20	404	515
21	349	515
22	<300	378
23	686	663
24	302	265
25	612	604
26	978	847
27	1442	1150
28	939	738

Tab. 3: Inter-Assay im niedrigen und hohen Messbereich einer Serumprobe eines Fohlens.

Datum der Messung	Probe 46 (mg/dl)	Probe 113 (mg/dl)
19.11.21	79	567
18.11.21	81	601
16.11.21	74	635
12.11.21	78	673
09.11.21	69	576

Tab. 4: Intra-Assay im niedrigen und hohen Messbereich einer Serumprobe eines Fohlens.

Probe 46 (mg/dl)	Probe 113 (mg/dl)
108	567
83	577
98	567
93	549
97	565
81	507
79	533
86	508
120	514



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-7108-0



9 783835 197108 0