

Abschlussbericht Projekt „NSBA-effektiv“

Entwicklung eines neuen Verfahrens zur effektiven Überwachung des Säure-Basen-Status in Milchviehherden unter Einbeziehung der Kühe in der Transitphase

A Kurzdarstellung

Ausgangssituation und Bedarf, Zielstellung des Projektes

Die Überwachung des Säure-Basenhaushaltes (SBH) stellt ein zentrales Element im metabolischen Monitoring von Milchkühen dar. In der Praxis hat sich die indirekte Beurteilung des SBH durch Messung der Netto-Säuren-Basen-Ausscheidung (**NSBA**) etabliert. Diese spiegelt die renalen Regelaufwand zur Aufrechterhaltung des neutralen Blut-pH wider und damit vorhandene azidotische (saure) oder alkalotische (basische) Belastungen. Dabei gibt es jedoch unterschiedliche Herangehensweisen zur Bestimmung der NSBA (Tabelle 1): die ursprüngliche Methode nach Kutas (1965), sowie eine vereinfachte und eine erweiterte, komplexere Arbeitsweise. Die vereinfachte Methode ist der *NSBA-Siebttest* nach Furcht und Grätsch, die erweiterte Methode die *differenzierte* oder auch *fraktionierte NSBA* (**NSBD**) nach Lachmann. Erstere ermöglicht nur eine grobe Einschätzung des SBH, wird aber von einigen kommerziellen Untersuchungslaboren angeboten. Letztere beinhaltet die Bestimmung des harnkonzentrationsunabhängigen Basen-Säuren-Quotienten (**BSQ**) und ist mit enormen Untersuchungsaufwand verbunden, damit finanziell nicht tragbar für routinemäßig durchgeführte Stoffwechselkontrollen in der Gesundheitsüberwachung von Rinderherden. Sie wird in der Regel nur als Pooluntersuchung durchgeführt und nicht anhand von Einzeltierproben. Poolproben sind jedoch stets mit Informationsverlust verbunden, da problematische Einzeltiere nicht mehr auffallen und sich gleichzeitig auftretende Azidosen und Alkalosen im Pool neutralisieren können.

In den Milchviehherden der AGRAR eG Münchenbernsdorf wie auch in einem Großteil der Thüringer Milchviehbetriebe sind regelmäßige Stoffwechseluntersuchungen ein fester Bestandteil der Gesundheitsüberwachung der Kühe. Der Tiergesundheitsdienst der Thüringer Tierseuchenkasse (**TGD**) führt diese Stoffwechseluntersuchungen durch und nutzt für die labordiagnostischen Untersuchungen das TGD-Labor. Das Institut für molekulare Pathogenese (**IMP**) des Friedrich-Löffler-Institutes führt regelmäßig Projekte zur Pathophysiologie verschiedener Nutztierkrankheiten durch, in welchen Blutgasuntersuchungen als direkte Methode zur Beurteilung des Säure-Basen-Status vorgenommen werden.

Ziel des Kooperationsvorhabens war es, die Aussagekraft der bestehenden Methoden (in Blut und Harn) zu validieren und eine praxistaugliche und exakte Überwachung des Säuren-Basen-Haushalts, evtl. durch Kombination verschiedener Methoden, zu entwickeln. Dabei sollte an einem Teil der Proben auch eine Methode herangezogen werden, welche bisher klinischen Einrichtungen vorbehalten war (traditionelle Blutgas-Analyse) und eine neue, direkte Methode zur Beurteilung des SBH zum Einsatz kommen, die bisher in der Diagnostik auf Bestandesebene noch nicht genutzt wird (Konzept der starken Ionen nach Stewart). Beide Methoden sollten auf ihre Praxistauglichkeit und ihren Mehrwert für die Diagnostik geprüft werden. Mit diesen Methoden würde eine von der renalen Filtration unabhängige Methode zur Überwachung des Säure-Basen-Status und zur Validierung der Harnuntersuchung zur Verfügung stehen.

Allgemeine Daten zum Projekt

Mitglieder der operationellen Gruppe:

AGRAR eG Münchenbernsdorf

Landwirtschaftliche Primärproduktion (Futterbau, Milchproduktion, Marktfruchtanbau)

Thüringer Tierseuchenkasse, Tiergesundheitsdienst und TGD-Labor

Rindergesundheitsdienst, Klinisch-Chemische Laboruntersuchungen

Friedrich-Löffler-Institut, Institut für molekulare Pathogenese

AG: Pathologie und Pathophysiologie, Blutgasanalysen

Laufzeit:

01/2016 – 12/2018

Budget:

Das Gesamtbudget belief sich auf 37271,98 €, von welchen 31855,54 € im Projektverlauf abgerufen wurden.

Ablauf des Vorhabens und Zusammenfassung der Ergebnisse

In das Projekt wurden neben dem Kooperationspartner AGRAR eG Münchenbernsdorf zusätzlich weitere 42 Thüringer Milchviehherden einbezogen. Die Milchkühe wurden im Rahmen der regelmäßig durchgeführten Stoffwechselkontrolle des Rindergesundheitsdienstes untersucht und beprobt. Dabei wurden pro Betrieb Tiere aus den Produktionsabschnitten mit dem höchsten Erkrankungsrisiko (Transitphase sowie Hochlaktation) in das Projekt einbezogen. Neben der Erfassung klinischer Parameter (Körperkondition, Pansenfüllung,

Körpertemperatur) wurden bei jedem Tier Blut- und Harnproben, bei einem Teil der Betriebe (n=19) zusätzlich auch noch spezielle Blutproben zur venösen Blutgasuntersuchung, entnommen. Grundsätzlich gliedert sich die Auswertung des Projektes dementsprechend in 2 Schwerpunkte:

- I) Aus den Harnproben wurde mittels verschiedener Untersuchungsmethoden (Tab. 1) die Netto-Säure-Basen-Ausscheidung (NSBA) bestimmt, anhand welcher der Säure-Basen-Status der Kühe evaluiert werden kann. Diese Beurteilung erfolgte sowohl auf Basis von Einzeltiererergebnissen als auch über die Ermittlung und Auswertung von Poolergebnissen.
- II) Bei einem Teil der untersuchten Tiere wurde zusätzlich eine Blutgasuntersuchung durchgeführt. Anhand der traditionellen Blutgas-Analyse sowie dem moderneren Ansatz des Konzeptes der starken Ionen nach Stewart wurden der Harnuntersuchung dieser Tiere eine andere und neuartige Beurteilung des Säure-Basen-Status gegenübergestellt.

In die Auswertung des ersten Schwerpunktes wurden insgesamt 855 Tiere in 127 Laktationsgruppen einbezogen. Tabelle 1 zeigt die verschiedenen Methoden zur titrimetrischen Bestimmung der NSBA. Im Anschluss an die Probenentnahme sowie die labordiagnostische Untersuchung der Proben wurde die statistische Auswertung durchgeführt. Alle Gruppen wurden nach den jeweiligen Methoden (NSBA, NSBA-Siebtest, NSBD und BSQ) anhand ihrer Einzeltiererergebnisse, den daraus gebildeten Mittelwerten und des Messwertes im Pool hinsichtlich azidotischer oder alkalotischer Belastung beurteilt und die Sensitivität und Spezifität der verschiedenen Methoden berechnet.

Jede dieser Methoden weist im Vergleich zur BSQ-Bestimmung auf Einzeltierebene eine abweichende Sensitivität und Spezifität auf (Tab. 4). Die als Referenz verwendete Bestimmung des BSQ ist eine sehr aufwändige Messung und damit zur Herdendiagnostik auf Einzeltierbasis wenig praxistauglich. Die NSBA ist weniger aufwendig und hinsichtlich der Beurteilung von Laktationsgruppen mit dem BSQ vergleichbar. Sie kann für den Praxiseinsatz empfohlen werden. Untersuchungen von Poolproben zur Bestimmung der NSBD oder des BSQ sind auf Grund der hohen Spezifität besonders empfehlenswert als Bestätigungsuntersuchung.

In die Auswertung der Blutgasanalyse wurden 145 Tiere aus 13 Betrieben eingeschlossen. Es wurde eine Clusteranalyse mit den gemessenen und errechneten Variablen aus Blut- und Harnuntersuchung durchgeführt. Dabei wurde die Beurteilung anhand der traditionellen Blutgasanalyse (Base Excess, Bicarbonationenkonzentration, pH-Wert des Blutes) mit der

Anwendung des moderneren Konzeptes der starken Ionen (Strong Ion Theory) nach Stewart verglichen und beide „direkte“ Methoden wurden der Harnuntersuchung als indirekte Methode zur Einschätzung des SBH gegenübergestellt. Die Auswertung der 7 erarbeiteten Cluster zeigt, dass das Strong Ion – Konzept eine bessere Einsicht in den Säure-Basen-Status der Kühe zu geben scheint als die herkömmliche Blutgasanalyse. Vor allem bei frisch abgekalbten Kühen können Störungen des SBH durch Änderungen des Proteinhaushaltes (durch Kolostrumgabe, mangelhafte Futteraufnahme, peripartale Entzündungen) mit den Parametern A_{tot} und SID besser differenziert werden, sodass die Blutgasmessung unter Verwendung der Strong Ion Variablen eine sinnvolle Ergänzung für das Monitoring des Säure-Basen-Status zu sein scheint.

Die Ergebnisse sind in der internationalen wissenschaftlichen Fachzeitschrift *PlosOne* veröffentlicht:

„Acid-base assessment of post-parturient German Holstein dairy cows from jugular venous blood and urine: A comparison of the strong ion approach and traditional blood gas analysis“

Diese Veröffentlichung ist jedermann im Internet frei zugänglich (Open Access) und unter dem folgenden Link einsehbar:

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210948>

B Eingehende Darstellung

Ausgangssituation und Projektaufgabenstellung

Bei Milchkühen sind metabolische Imbalancen eine entscheidende Prädisposition für infektiöse Faktorenkrankheiten im Bestand (z.B. Infektionen der Milchdrüse, der Atemwege, des Genitaltraktes). Neben dem primären Krankheitswert azidotischer und alkalotischer Störungen gelten auch klinisch latente Säuren-Basen-Dysbalancen als entscheidende prädisponierende Faktoren für Krankheiten metabolischer Genese (z. B. Rehe, Ketose, Anöstrie), die ihrerseits wiederum die Anfälligkeit des Wirtes gegenüber fakultativ pathogenen Keimen erhöhen können.

Insbesondere bei intensiver Fütterung, wie heute in vielen Beständen üblich, können metabolische Erkrankungen der Wiederkäuer, wie die chronische metabolische Azidose und andere Störungen des Säuren-Basen-Haushalts, erheblichen Einfluss auf den allgemeinen Gesundheitsstatus der Tiere haben. Die Früherkennung kritischer metabolischer Imbalancen hat demzufolge großen Wert für die Erhaltung von Gesundheit und Wohlbefinden der Milchkühe bzw. die Überwachung von Milchviehherden.

Für laktierende Kühe ist eine solche Überwachung mit Hilfe des Fett-Energie-Quotienten (FEQ) in die Milchleistungsprüfung etabliert. Dieses System ist jedoch wenig präzise, da es sich lediglich zweier Parameter ohne engen Bezug zum Säuren-Basen-Haushalt bedient (Fett- und Eiweißgehalt der Rohmilch). Zudem erfasst es die meisten Kühe in der Transitphase nicht, weil diese noch nicht in die Milchleistungsprüfung einbezogen sind. Jedoch häufen sich gerade bei diesen Transit-Kühen (Vorbereiter, Frischkalber, Anfütterungsgruppe) die Störungen des Säuren-Basen-Haushalts. Wesentliche Gründe dafür sind die uneinheitlichen Futteraufnahme der einzelnen Kühe (herabgesetzte Futteraufnahme, selektives Fressen, ungenügende Aufnahme strukturwirksamer Rohfaser) und daraus resultierende Pansenfermentationsstörungen. Diese sind wichtige prädisponierende Faktoren für Sekundärerkrankungen (z.B. Puerperalstörungen, Klauenerkrankungen).

Die bisher in Thüringen praxisübliche Methode zur Überwachung des Säuren-Basen-Status der Milchkühe in der Transitphase ist die Bestimmung der Netto-Säuren-Basen-Ausscheidung nach KUTAS (NSBA). Diese ist in die vom TGD angebotene Stoffwechselüberwachung integriert. Problematisch ist, dass das Messergebnis dieser Methode von der renalen Filtration und damit

der Harnkonzentration abhängt. Eine Weiterentwicklung dieser Methode, die differenzierte NSBA nach LACHMANN (NSBD) beinhaltet die getrennte Bestimmung des Basengehalts, des Säurenüberschusses und des Gehalts am Ammoniumionen (NH_4) und damit die Berechnung des Basen-Säuren-Quotienten (BSQ). Dieser ist von der Harnkonzentration unabhängig. Auf Grund des hohen manuellen Arbeitsaufwandes wird diese Methode in der Praxis gegenwärtig nur in Ausnahmefällen in der Regel als Pooluntersuchung eingesetzt. Damit ist jedoch der entscheidende Nachteil verbunden, dass durch das Poolen die problematischen Einzeltiere nicht mehr auffallen. Außerdem kann es durch gleichzeitiges Auftreten von Azidosen und Alkalosen und deren Neutralisation im Pool zu fehlerhaften Diagnosen auf Herdenebene kommen.

Neben der NSBD wurde im Rahmen der Stoffwechselüberwachung der NSBA-Siebttest (nach Furcht und Grätsch) entwickelt, der die Untersuchung größerer Tiergruppen mit geringerem Aufwand erlaubt. Diese Methode ist ungenauer als die NSBA, allerdings lässt sich damit für jedes Einzeltier zumindest die Richtung der Veränderung zuverlässig feststellen (Azidose oder Alkalose). Sowohl die NSBD als Pooluntersuchung als auch der Siebttest werden in Deutschland routinemäßig zur Herdenüberwachung eingesetzt. Ältere Untersuchungen verweisen auf die gute Nutzbarkeit die Siebttestes (Schönfelder 1986) oder der Pooluntersuchung (Lehwenich 1999) zur Beurteilung des Säure-Basen-Status.

Im ersten Schwerpunkt des Projektes sollte die Testgüte aller Methoden anhand einer großen Probenanzahl aus unterschiedlichen Laktationsstadien und unter Einbeziehung vieler Thüringer Betriebe geprüft werden. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten basierte die Laktationsgruppenbeurteilung in der vorliegenden Untersuchung nicht auf dem Mittelwert – Poolwert – Vergleich, sondern die Abweichungen der Einzeltiere wurden ebenfalls zur Bewertung berücksichtigt.

Ein direkter Einblick in den SBH ist über eine Blutgasuntersuchung möglich. Dabei werden bei der traditionellen Blutgasanalyse, abgeleitet von der HENDERSON-HASSELBALCH-Gleichung, der pH- Wert des Blutes, der Partialdruck von Kohlendioxid (pCO_2) und - davon abgeleitet - die Konzentration von Bicarbonat (HCO_3^-) und der Basenüberschuss (base excess, BE) im arteriellen oder venösen Blut beurteilt. In den 1980ern hat STEWART ein neues Konzept zur Bewertung des SBH entwickelt, welches sich nach den Gesetzen der Elektroneutralität, der Erhaltung der Masse und des Dissoziationsgleichgewichtes richtet. Nach seiner Theorie wird der pH-Wert des Blutes durch 3 - voneinander unabhängigen - Faktoren beeinflusst: dem pCO_2 , der Differenz der starken Ionen (SID) und dem Gesamtgehalt an nichtflüchtigen, schwachen Puffer-Säuren (A_{tot}) (Stewart 1983). Anhand dieser Komponenten

sollen metabolische Veränderungen besser charakterisierbar sein: eine metabolische Azidose liegt bei einer Erniedrigung der SID oder einer Erhöhung von A_{tot} vor, eine metabolische Alkalose hingegen ist an einer Erhöhung der SID oder einer Erniedrigung von A_{tot} erkennbar. Zusätzlich besteht die Möglichkeit, durch das Strong Ion Gap (SIG) ungemessene starke Ionen wie Ketokörper darzustellen. Für die Anwendung der „Strong Ion Theory“ wurden durch die Arbeitsgruppe um CONSTABLE für Rinder geltende Berechnungsgrundlagen für o. g. Variablen erstellt und Studien an klinisch kranken Tieren durchgeführt (Constable 1999, 2002, 2014; Trefz et al. 2015).

Bisher fand die Blutgasuntersuchung vorwiegend bei klinisch kranken Tieren Anwendung, da viele Einzelbestimmungen erforderlich sind, die Blutgasanalyse an bestimmte technische Voraussetzungen gebunden ist und die befristete Haltbarkeit der Proben den Praxiseinsatz limitiert. Im zweiten Schwerpunkt des Projektes sollte die Anwendbarkeit der Blutgasanalyse unter Einbeziehung des modernen Strong Ion Konzeptes für die metabolische Überwachung von Rinderbeständen getestet werden.

Projektverlauf und Ergebnisse

Im Projektbetrieb wurden zu 15 Untersuchungszeitpunkten Milchkühe in verschiedenen Laktationsstadien beprobt. Es wurden dabei stets Harnproben sowie Blutproben zur Blutgasuntersuchung und klin.-chem. Untersuchung entnommen. Dazu wurden 42 weitere Thüringer Milchviehbetriebe in das Projekt integriert. Die Probenentnahmen in diesen Betrieben erfolgten im Rahmen des routinemäßig stattfindenden Monitorings der Stoffwechselfgesundheit durch die Tierärzte des Rindergesundheitsdienstes. Pro Betrieb eine Stichprobe an Tieren (\emptyset 6,6; Minimum: 3; Maximum:10) aus 3 Laktationsstadien (entspricht Fütterungsgruppen) mit dem höchsten Erkrankungsrisiko untersucht: Trockensteher (**TS**): 3 – 1 Woche vor dem erwarteten Abkalbetermin, Frischabkalber (**FAK**): 2 – 10 Tage nach der Abkalbung und Laktierer (**LAK**): 30 – 100 Tage nach der Abkalbung. Es erfolgte eine kurze klinische Untersuchung der Tiere: die Erhebung des Body Condition Score (BCS), der Pansenfüllung sowie die Messung der rektalen Körpertemperatur, sichtbar klinisch kranke Tiere wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Anschließend erfolgte die Blutprobenentnahme aus den A./V. coccygeae oder der V. jugularis sowie die Harnprobenentnahme mittels Harnkatheter (Abb. 1) in drei Proberöhrchen mit je 12 ml Volumen, die sofort nach der Entnahme luftdicht verschlossen wurden, um pH-Wert-Änderungen zu vermeiden.



Abb. 1: Harnprobenentnahme mittel Harnkatheter nach Breslau

Alle gewonnenen Proben wurden nach der Entnahme gekühlt, innerhalb von 24 Stunden ins Labor des Tiergesundheitsdienstes Thüringen transportiert und bis zur Untersuchung bei -20°C gelagert. Bei einem Teil der Betriebe ($n=19$) sowie dem kooperativen Projektbetrieb wurden zusätzlich Blutproben für eine Blutgasuntersuchung entnommen und innerhalb kurzer Zeit und gekühlt ins Labor des FLI transportiert. Bei diesen Betrieben wurde die Probenentnahme sowie der Probentransport durch Mitarbeiter des IMP unterstützt, um einen reibungslosen Ablauf sowie eine rasche Probengewinnung zu gewährleisten. Dort erfolgte innerhalb weniger Stunden die Analyse der Blutgase und Ionenzusammensetzung des venösen Blutes.

Die klin.-chem. Untersuchung der Blut – und Harnproben fand im TGD-Labor statt. Aus den Harnproben eines Tieres wurde zunächst der pH-Wert mittels pH-Meter gemessen und anschließend titrimetrisch die NSBA, die fraktionierte NSBA (NSBD) mit Basenüberschuss, Säureüberschuss, Ammoniumgehalt und dem BSQ sowie der Siebttest bestimmt (Tab. 1, Abb. 2-3).

Tabelle 1 Methodenbeschreibungen zur Bestimmung der Netto-Säure-Basen-Ausscheidung (NSBA)

NSBA	Fraktionierte NSBA (NSBD)	Siebstest
<i>nach Kutas</i>	<i>nach Lachmann</i>	<i>nach Furcht/Grätsch</i>
<p>> 10 ml Harn schütteln, mit 1 n HCl auf pH < 4 titrieren</p> <p>> 30 Sekunden kochen, abkühlen</p> <p>> 10 ml 20 %ige Formaldehydlösung und 6 Tropfen Phenolrot-Indikator hinzugeben</p> <p>> mit 0,1 n NaOH bis zum Farbumschlag zu orange-rot titrieren</p>	<p>> vor jeder Messung pH-Meter mit Standardpufferlösungen kalibrieren</p> <p>> 10 ml Harn mit 1 n HCl bis pH 3,5 titrieren = <i>Basenüberschuss</i></p> <p>> 30 Sekunden kochen, abkühlen</p> <p>> mit 0,1 n NaOH bis pH 7,4 titrieren (1) = <i>Säurenüberschuss</i></p> <p>> 10 ml 20 %ige Formaldehydlösung zugeben</p> <p>> mit 0,1 n NaOH bis pH 7,4 titrieren (2) = <i>Ammoniumkonzentration</i></p>	<p>> 0,5ml Harn mit 0,2 ml HCl versetzen</p> <p>> 5 min im Wasserbad erhitzen</p> <p>> 0,5 ml Formaldehyd – Phenolrot-Lösung hinzugeben</p> <p>> Schrittweise 0,05 ml 1n NaOH bis zum Farbumschlag hinzugeben</p> <p>> zugegebene Menge an NaOH entspricht NSBA</p>
<p>NSBA (mmol/l) = 10 x (10 x HCl-Verbrauch (ml) – NaOH-Verbrauch (ml))</p>	<p>NSBD (mmol/l) = 10 x (10 x HCl-Verbrauch (ml) – NaOH(1)-Verbrauch (ml) – NaOH(2)-Verbrauch (ml))</p> <p>BSQ = 10 x HCl-Verbrauch (ml) / (NaOH(1)-Verbrauch (ml) + NaOH(2)-Verbrauch (ml))</p>	<p>(ml) NaOH NSBA(mmol/l)</p> <p>0,05 > 300</p> <p>0,1 200 – 300</p> <p>0,15 100 – 200</p> <p>0,2 0 – 100</p> <p>≥ 0,25 < 0</p>



Abb. 2 a und b: Zugabe von Phenolrot als Indikator (links) sowie Formaldehyd (rechts) bei der Bestimmung der NSBA



Abb. 3: Titration der NSBA bis zum Farbumschlag nach orange-rot

Anschließend erfolgte innerhalb der Laktationsstadien (Laktationsgruppen, Fütterungsgruppen) die Bildung der Poolproben aus jeweils gleichen Teilen der

Einzeltierharnproben und die Bestimmung von NSBD und BSQ in diesen. Eine Übersicht über die im Rahmen des Projektes ermittelten Parameter in Blut und Harn gibt Tabelle 2.

Tabelle 2 Übersicht über die im Projekt erhobenen Parameter in Blut – und Harn

Parameter	Blut	Harn
NSBA		*
NSBD		*
BSQ		*
NSBA-Siebttest		*
Natrium ⁺	*	*
Kalium ⁺	*	*
Chlorid ⁻	*	*
Kalzium ⁺	*	*
Magnesium	*	*
Gesamteiweiß	*	
Albumin	*	
γ-Globuline	*	
NEFA	*	
BHB	*	
GLDH	*	
Standard-Bicarbonat (SBC)	*	
Base Excess (BE)	*	
pH-Wert	*	*
Anion Gap (AG)	*	
Strong Ion Gap (SIG)	*	
Strong Ion Difference (SID)	*	
Acid Total (A _{tot})	*	

Für die Auswertung des ersten Projektschwerpunktes wurden insgesamt 876 Milchkühe in 130 Laktationsgruppen aus 43 Betrieben in die Studie integriert. Aus dem kooperativen Projektbetrieb sind anteilig je eine TS, FAK – und LAK – Gruppe in die Auswertung der Gruppenbeurteilung einbezogen worden. Bei den übrigen 42 Betrieben wurden in 3 Betrieben jeweils 2 LAK-Gruppen untersucht, sodass für einen Teil der Auswertung je eine LAK-Gruppe pro Betrieb ausgeschlossen wurde (ergibt gesamt n= 127 Gruppen, 855 Tiere).

Es erfolgte eine Bewertung aller Laktationsgruppen in Bezug auf ihre Einzelwerte und den Gruppenmittelwert. Die Gruppen wurden sowohl anhand ihrer Einzeltiererergebnisse (**EW**) aus BSQ (Referenz), NSBA, NSBD und Siebttest als auch anhand ihres NSBD- und BSQ – Pool-Ergebnisses (**PW**) als „azidotisch belastet“, „alkalotisch belastet“, „gemischte Belastung“ oder „ohne Belastung“ klassifiziert. Als Grundlage zur Beurteilung der Gesundheits- und Leistungsgefährdung einer Laktationsgruppe dienten die physiologischen Kontroll – und Toleranzgrenzen (Tab. 3). Dabei dienen die Toleranzgrenzen zur Bewertung von Messung an

Einzeltieren und die Kontrollgrenzen zur Beurteilung eines Gruppenmittelwertes oder einer Poolprobe.

Tabelle 3 Untere und obere Kontroll – und Toleranzgrenzen zur Beurteilung der Parameter NSBA bzw. NSBD und BSQ nach Fürll 2014

Parameter im Harn	Kontrollgrenzen		Toleranzgrenzen	
	K _u	K _o	T _u	T _o
NSBA/NSBD (mmol/l)	107	193	83	215
BSQ	2,6	3,8	1,8	4,6

Eine auf Basis der Untersuchung von Einzeltieren bewertete Gruppe galt als azidotisch oder alkalotisch belastet, wenn der Gruppenmittelwert der Analyseergebnisse unter- oder oberhalb der Kontrollgrenzen lag oder wenn sich >20 % der Einzelwerte gleichgerichtet unter – oder oberhalb der Toleranzgrenzen befanden. Die Bewertung der Laktationsgruppe anhand der NSBD- bzw. BSQ-Pooluntersuchung erfolgte nach den Kontrollgrenzen. Für die Ergebnisse des Siebtestes fanden < 100 oder >200 mmol/l als Toleranzgrenzen Verwendung. Die Beurteilung der Gruppe anhand der BSQ-Einzelwert-Untersuchung diente als Referenzwert.

Zunächst wurde anhand der BSQ-Einzelwert-Beurteilung für die gesamte Stichprobe sowie innerhalb der Laktationsstadien die Anteile von azidotischen, alkalotischen oder Gruppen ohne Beanstandung berechnet. Dann wurde geprüft, ob die Einschätzung des Säure-Basen-Haushaltes der Laktationsgruppe anhand der NSBD-EW, der NSBA-EW oder der Siebttest-EW sowie der NSBD-PW und BSQ-PW mit der Beurteilung anhand der BSQ-EW vergleichbar ist. Zur Bestimmung der Testgüte der verschiedenen Methoden wurden Vierfeldertafeln erstellt darüber die Sensitivität, Spezifität und Gesamtübereinstimmung der Methoden berechnet.

Im Rahmen der Auswertung wurden 48,8% aller Laktationsgruppen als azidotisch belastet eingestuft. Dabei war ein großer Teil der Frischabkalber (75,6%) sowie etwa die Hälfte der Trockensteher (50%) und ein Fünftel der Laktierer (21,5%) azidotisch belastet. Im Gegensatz dazu wurde bei 18,4% der Gruppen eine Erhöhung des BSQ festgestellt. Dies war am häufigsten bei den Laktieren (33,3%) zu finden, weniger bei den Trockenstehern (16,7%) und bei den Frischabkalbern (4,9%).

Die errechneten Testgütekriterien Sensitivität, Spezifität und Gesamtübereinstimmung der Laktationsgruppenbewertung anhand der Einzeltielergebnisse von NSBD -, NSBA - und Siebttest sowie nach BSQ- und NSBD – Pool – Untersuchung sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4 Übereinstimmungsmatrix der Beurteilung der Laktationsgruppen als azidotisch oder alkalotisch belastet anhand der NSBD EW (Einzelwerte), der NSBA-EW und der Siebttest-EW sowie der BSQ-PW (Poolwerte) und der NSBD-PW im Vergleich zu den BSQ-EW als Referenz mit den daraus errechneten Testgütekriterien

			BSQ-EW			Sens	Spez	GÜ
			AZ	oB	gesamt			
azidotische Belastung	NSBD-EW	AZ	47	8	55	0,77	0,80	0,78
		oB	14	33	47			
	NSBA-EW	AZ	53	12	65	0,87	0,71	0,8
		oB	8	29	37			
	Siebttest-EW	AZ	56	15	71	0,92	0,63	0,8
		oB	5	26	31			
	BSQ-PW	AZ	60	12	72	0,98	0,71	0,87
		oB	1	29	30			
	NSBD-PW	AZ	45	1	46	0,74	0,98	0,83
		oB	16	40	56			
gesamt			61	41	102			
alkalotische Belastung	NSBD-EW	ALK	18	13	31	0,78	0,68	0,72
		oB	5	28	33			
	NSBA-EW	ALK	19	7	26	0,83	0,83	0,83
		oB	4	34	38			
	Siebttest-EW	ALK	13	15	28	0,57	0,63	0,61
		oB	10	26	36			
	BSQ-PW	ALK	17	2	19	0,74	0,95	0,88
		oB	6	39	45			
	NSBD-PW	ALK	11	2	13	0,48	0,95	0,78
		oB	12	39	41			
gesamt			23	41	64			

Fußnote zur Tab.4: AZ = azidotisch beanstandet; ALK = alkalotisch beanstandet; oB = ohne Beanstandung; Bewertungsgrundlagen im Text; Sens = Sensitivität; Spez = Spezifität; GÜ = Gesamtübereinstimmung

Im Vergleich zur Gruppenbewertung anhand der BSQ-EW zeigte der BSQ-PW die beste Sensitivität (0,98) zur Erkennung azidotisch belasteter Laktationsgruppen, gefolgt von Siebttest-EW (0,92), NSBA-EW (0,87) und NSBD-EW (0,77). Der NSBD-PW wies die schlechteste Sensitivität (0,74), dafür jedoch die höchste Spezifität (0,98) im azidotischen Bereich auf. Im Gegensatz dazu waren im alkalotischen Bereich die Sensitivitäten deutlich schlechter bei guten bis mäßigen Spezifitäten. Die NSBA zeigte zur Detektion alkalotischer Belastungen die beste kombinierte Testgüte mit einer Sensitivität und Spezifität von je 0,83. Die Pooluntersuchungen wiesen lediglich sehr hohe Spezifitäten auf (0,95), NSBD-EW und Siebttest-EW zeigten zur Erkennung von Alkalosen die schlechteste Gesamtübereinstimmung mit nur mäßigen Sensitivitäten und Spezifitäten.

Von den 127 Laktationsgruppen wurden 2 Gruppen aus dem Testgüte-Modell ausgeschlossen, da sie anhand ihrer BSQ-EW sowohl azidotische als auch alkalotische Belastungen anzeigten. Es handelte sich dabei um je eine FAK- und eine LAK-Gruppe. In der Pool-Untersuchung wies eine der beiden Gruppen gar keine Abweichung, die andere Gruppe lediglich eine Abweichung in die azidotische Richtung auf.

Der zweite Projektschwerpunkt befasste sich mit der Durchführung der Blutgasanalyse. Die statistische Auswertung sowie deren Ergebnisse sind ausführlich in der dazugehörigen Veröffentlichung dargestellt.

(<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210948>).

Bewertung der Ergebnisse

Zur Bestimmung der Testgüte der Methoden zur Erkennung azidotisch oder alkalotisch belasteter Laktationsgruppen wurden die Ergebnisse aus Einzelwerten von NSBD, NSBA und Siebtest sowie aus der Pooluntersuchung von NSBD und BSQ dem als Referenz gesetzten BSQ aus Einzelwerten gegenübergestellt (Tab. 4). Dabei wies die NSBD nur eine mäßige Sensitivität für das Erkennen azidotisch belasteter Gruppen bei guter Spezifität auf. Die NSBA zeigte sich im Vergleich dazu deutlich sensitiver bei demgegenüber schlechterer Spezifität. Eine Ursache hierfür könnte sein, dass die NSBA im Durchschnitt etwas niedriger gemessen wurde als die NSBD (123 vs. 132 mmol/l; Mittelwert über alle Laktationsgruppen), womit sie im azidotischen Bereich sensitiver, dafür aber weniger spezifisch misst. Zur Erkennung von Alkalosen zeigt die NSBD keine akzeptable Testgüte mehr, Sensitivität und Spezifität von der NSBA sind hingegen ausreichend zur Diagnostik. Festzuhalten bleibt, dass die NSBD trotz ihrer erweiterten, objektiveren und damit genaueren titrimetrischen Bestimmung keine besseren Ergebnisse zu liefern vermag als die NSBA nach Kutas (Abb. 4).

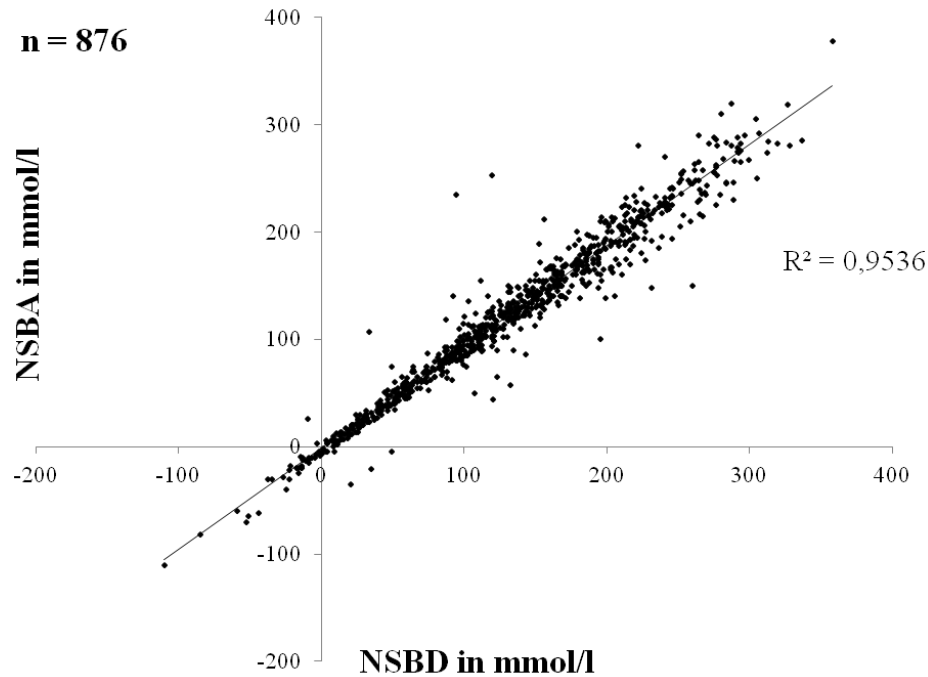


Abb. 4: NSBD- und NSBA-Ergebnisse aller Tiere grafisch gegeneinander aufgetragen: Es zeigt sich eine sehr gute Übereinstimmung der tritrimetrisch ermittelten Werte.

Die NSBA kann daher zur Routinediagnostik empfohlen werden. Tatsächlich scheint die erweiterte NSBD eher als Pooluntersuchung und damit als Ergänzung zur NSBA-Einzeltierdiagnostik geeignet, und wäre dementsprechend vor allem bei unklarer Fütterungsanamnese oder bei Verdacht auf starke Schwankungen in der Harnkonzentration zu empfehlen.

Bei Anwendung des Siebtests zeigte sich ähnlich zur Einzeltierbeurteilung eine sehr gute Sensitivität bei mäßiger Spezifität für die Erkennung azidotisch belasteter Laktationsgruppen. Verbessern könnte man die Spezifität mitunter durch die Anpassung der Titrationsvolumina, sodass in kleineren Schritten titriert werden müsste. Im alkalotischen Bereich war die Testgüte mangelhaft. Eine mögliche Ursache könnte das geringe Probenvolumen (0,5ml) darstellen, welches die ohnehin schon subjektive Titration bei der Durchführung des Siebtestes noch verschärft. Der optische Farbumschlag ist vor allem bei sehr blassen oder stark eigengefärbten Harnproben mitunter schlechter zu erkennen. Der Siebtest kann daher im Gegensatz zu früheren Untersuchungen (Schönfelder 1986) nur eingeschränkt zur Überwachung des SBH von Milchkühen empfohlen werden. Eventuell sind die Abweichungen in der Beurteilung durch die differente, gröbere Titration bei der Durchführung des Siebtestes in dieser Untersuchung im

Vergleich zu früheren Untersuchungen bedingt, denn für die Arbeitsanweisung gibt es ebenso eine zweite Variante, welche in kleineren Schritten und damit genauer titriert und dadurch mitunter bessere Ergebnisse zu liefern vermag. Die Verbesserung der Aussagekraft des Siebtestes vor allem im alkalotischen Bereich durch o.g. Maßnahmen sollte geprüft werden.

Die Ergebnisse der Pool – Untersuchung zeigten eine deutlich schlechtere Testgüte der NSBD im Vergleich zum BSQ, letzterer wies zur Erkennung azidotisch belasteter Gruppen eine hohe Sensitivität bei mäßiger Spezifität auf und scheint damit ein besseres diagnostisches Kriterium in der Pool-Untersuchung zu sein als die NSBD, welche sich lediglich durch eine hohe Spezifität auszeichnete. Zur Erkennung von Alkalosen erscheint die Pool – Untersuchung weniger geeignet, denn sowohl für die NSBD als auch für den BSQ errechneten sich schlechte Sensitivitäten im Vergleich zur Bewertung der Laktationsgruppe auf der Basis der BSQ-Einzelwerte .Dabei hatten beide Parameter jedoch eine hohe Spezifität, sodass sich für Praxis ein Einsatz der Pool-Untersuchung als Bestätigungsuntersuchung zum Ausschluss falsch positiver Beurteilungen der Tiergruppen anbietet. Als Screening-Untersuchung scheint lediglich der BSQ-Pool zur Erkennung azidotisch belasteter Laktationsgruppen geeignet zu sein.

Zusammenfassung der Ergebnisse

In der Laktationsgruppenbewertung bewies sich die NSBA als geeignete Methode für Screening-Untersuchungen anhand von Einzeltierbetrachtungen. Sie zeigte im Unterschied zu allen anderen untersuchten Methoden die stabilsten Testgütekriterien für die Erkennung sowohl azidotischer als auch alkalotischer Belastungen. Die weitere Vereinfachung der NSBA als Siebttest bringt zwar Vorteile in der technischen Handhabung im Labor, da auch kleinere Mengen Harn untersucht werden könnten, jedoch war der diagnostische Wert weit begrenzter als mit der NSBA. Der **Einsatz von Pooluntersuchungen** sollte stets **kritisch** geprüft werden. Sie zeichneten sich durch hohe Spezifität bei begrenzter Sensitivität aus und sind daher als Bestätigungsuntersuchungen und weniger als Screening-Untersuchungen zu empfehlen

Die gegenwärtige gesellschaftliche Diskussion um die Gewährleistung des Tierschutzes in der Nutztierhaltung und die Reduktion des Antibiotikaeinsatzes erfordert von allen Marktbeteiligten verstärkte Bemühungen um die Gesunderhaltung der Tiere. In der Milchviehhaltung spielt hierbei die Vermeidung metabolischer Imbalancen eine entscheidende Rolle, ein wichtiges Instrument ist hierfür die regelmäßige Stoffwechselüberwachung anhand von Blut –und Harnproben. Diese wird in Thüringen bisher vom Tiergesundheitsdienst der Thüringer Tierseuchenkasse angeboten und von ca. 100 Milchviehhaltern regelmäßig genutzt. Die **NSBA als Methode der Wahl** zur Beurteilung des SBH und zur Erkennung metabolischer Störungen konnte durch diese Projektergebnisse bestätigt werden. Damit kann die routinemäßige Harnuntersuchung in ihrer Aussage gestärkt und damit **die fachliche Position des Tiergesundheitsdienstes gefestigt** werden. Gesunderhaltung der Kühe führt zur Stärkung der Leistungsbereitschaft des Einzeltieres und damit auch des Tierbestandes. Durch eine gute Milchleistung wird die **Wettbewerbsfähigkeit und damit die Marktposition der Thüringer Milcherzeuger** sowohl in der Milcherzeugung also auch im Zuchtviehverkauf **verbessert**.

Die **moderne Blutgasanalyse** erwies sich als **sinnvolle Ergänzung** zum derzeit in Thüringer Milchviehherden etablierten metabolischen Monitoring-Programm Mit den errechneten Variablen SID und A_{tot} ist eine differenziertere Beurteilung des SBH bei frisch abgekalbten Kühen möglich als mit der traditionellen Blutgasanalyse oder der NSBA. Eine **Umsetzung der Ergebnisse in die Praxis** (Einschluss von Blutgasanalysen in Routine-Stoffwechselprofile, Anwendung bei anderen Tierarten, Erwerb eines portablen Blutgasanalyse-Gerätes) wird derzeit beim Tiergesundheitsdienst Thüringen geprüft.

Weiterhin ist diese Methode in Feldstudien zu metabolischen Störungen anwendbar. Denkbar ist eine **künftige Zusammenarbeit** des TGD mit dem FLI (IMP) zu Forschungsarbeiten an

anderen Tierarten (Schaf/Ziege, Schwein). Wichtig für künftige Untersuchungen oder Studien ist die **Ermittlung von tierartspezifischen Referenzwerten** zur Umsetzung des Strong-Ion-Konzeptes beim landwirtschaftlichen Nutztier. Weiteren **Forschungsbedarf** gibt es auch zum **Einfluss von Fütterungszusätzen** wie Saure Salze oder Pansenpuffer auf die Ergebnisse der modernen Blutgasanalyse.

Als klinisches bzw. labordiagnostisches **Nebenergebnis** ist zu erwähnen, dass die venöse Blutgasmessung unter Anwendung des „Strong Ion“ – Konzeptes auch mit geringer zeitlicher Verzögerung (nicht unmittelbar nach Blutentnahme, sondern 2-4 h später) möglich scheint, denn es wurden statistisch auswertbare Messergebnisse erzielt.

Als weiterer wichtiger methodischer Aspekt ist die Wahl des Entnahmeortes der Blutprobe: nach der Blutprobenentnahme aus den Coccygealgefäßen gab es vermehrt Messfehler aufgrund von Mikro-Gerinnseln in der Probe, sodass dieser Entnahmeort nicht für die Blutgasanalyse empfohlen werden kann. Die Probenentnahme für eine Blutgasanalyse muss demnach aus der Vena jugularis erfolgen. Das ist ein wichtiges Ergebnis für zukünftige Feldstudien zu diesem komplexen Thema, denn bisher war die Blutprobenentnahme aus den Coccygealgefäßen aufgrund der Praktikabilität die Methode der Wahl für Stoffwechseluntersuchungen.

Kommunikations- und Disseminationskonzept

Die Ergebnisse wurden bisher auf verschiedenen Fortbildungsveranstaltungen für Tierärzte präsentiert:

06.04. 2017 - Gemeinsame Fortbildung der MSD Tiergesundheit und der Thüringer Tierseuchenkasse für Tierärzte in Erfurt
 "Azidose oder Alkalose – Was leistet die NSBA zur Bewertung des Säure-Basen-Haushalts in Milchviehherden?"
 (T. Gärtner)

13.06.2017 - 42. Leipziger Laborfortbildung "Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung" der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig
 "Was leistet die NSBA zur Bewertung des Säure-Basen-Haushalts in Milchviehherden?"
 (K. Donat)

29. 06. 2017 - Arbeitstreffen der bundesdeutschen Rindergesundheitsdienste in Herrsching
 "Was leistet die NSBA zur Bewertung des Säure-Basen-Haushalts in Milchviehherden?"
 (T. Gärtner)

22.06.2018 - 43. Leipziger Laborfortbildung "Labordiagnostik in der Bestandsbetreuung" der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig
 "Konzept der starken Ionen nach Stewart - eine Alternative für die Bewertung des Säure-Basen-Haushalts von Milchkühen?"
 (T. Gärtner)

„Acid-base assessment of post-parturient German Holstein dairy cows from jugular venous blood and urine: A comparison of the strong ion approach and traditional blood gas analysis“
 PlosOne, 06.01.2019
<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0210948>.

Verwendung der Zuwendung

	Budget bewilligt	Budget abgerechnet
Personalausgaben		30660,73 €
Sachausgaben (allg. Geschäftsausgaben, Laboruntersuchungen, Verbrauchsmaterial)		7566,05 €
Ausgaben für Veröffentlichung		1592,65 €
Investitionsausgaben		-
davon Eigenleistung	9340,00 €	7963,89 €
ausgezahlter Zuschuss	37360,00 €	31855,54 €
gesamt	46700,00 €	39819,43 €

Literatur:

Constable PD. Clinical assessment of acid-base status. Strong ion difference theory. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1999;15(3):447-71.

Constable PD. Calculation of variables describing plasma nonvolatile weak acids for use in the strong ion approach to acid-base balance in cattle. *Am J Vet Res.* 2002;63(4):482-90.

Constable PD. Acid-base assessment: when and how to apply the Henderson-Hasselbalch equation and strong ion difference theory. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2014;30(2):295-316

Fürll M. Spezielle Untersuchungen beim Wiederkäuer. In: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, 7. Aufl. Moritz A, Hrsg., Stuttgart, Schattauer 2014; 726-777

Furcht G, Grätsch U. Screeningmethoden zur Stoffwechselüberwachung. *Inst. angew. Tierhyg., Eberswalde-Finow* 1983

Kutas F. Determination of Net Acid-Base Excretion in the Urine of Cattle. A Method for the Estimation of Acid-Base Equilibrium. *Acta Vet Acad Sci Hung* 1965; 15: 147-153

Lachmann G, Schäfer M. Diagnostik fütterungsbedingter metabolischer Azidosen und Alkalosen beim Rind. *Wiss. Z. Karl-Marx-Univ. Leipzig, Math.-Naturwiss. R.* 1985; 34: 366-474

Lehwenich T. Untersuchungen zur Durchführung der Stoffwechselüberwachung in der Bestandsbetreuung von Milchviehherden. Berlin, Diss med vet FU Berlin 1999

Schönfelder K. Vergleichende Betrachtungen von NSBA-, NSBA-Siebttest- und differenzierter NSBA-Bestimmung im Harn. Ingenieurabschlussarbeit der Ingenieurschule für Veterinärmedizin Rostock, Fachrichtung Labordiagnostik, Jena 1986

Stewart PA. Modern quantitative acid-base chemistry. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.* 1983;61(12):1444-61.

Trefz FM, Constable PD, Lorenz I. Quantitative physicochemical analysis of acid-base balance and clinical utility of anion gap and strong ion gap in 806 neonatal calves with diarrhea. *Journal of veterinary internal medicine.* 2015;29(2):678-87. Epub 2015/03/31.