

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methode

3.1.1 Patientengut

Es wurden 102 Kaninchen untersucht, die im Rahmen der „Heimtiersprechstunde“ in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin vorgestellt wurden. Dabei wurde keinerlei Auswahl bezüglich Vorstellungsgrund, Alter, Rasse oder Geschlecht getroffen. Es wurden ausschließlich Tiere untersucht, die als Heimtiere gehalten wurden. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich von Januar 1998 bis Januar 1999. Die Tiere wurden anhand der klinischen Diagnose in Gruppen eingeteilt. Bei allen Tieren wurde eine Harnuntersuchung mit mikrobiologischer Diagnostik und, soweit möglich eine Blut- und eine Serumuntersuchung durchgeführt. Weitere Untersuchungen wie z.B. Röntgen, Sonographie oder Pathologie schlossen sich bei Notwendigkeit an. Bei stationären Patienten oder bei klinischer Relevanz wurden an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen Harnuntersuchungen durchgeführt.

3.1.2 Klinische Untersuchung

3.1.2.1 Anamnese

Bei der Erhebung des Vorberichtes wurden das Alter und Geschlecht des Tieres, der Vorstellungsgrund mit Dauer und Art eventuell vorhandener Krankheitsanzeichen sowie die Haltungs- und Fütterungsbedingungen erfragt.

3.1.2.2 Allgemeine klinische Untersuchung

Alle Tiere wurden einer gründlichen klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen.

Dabei wurden:

- der Ernährungs- und Pflegezustand beurteilt
- Fell, Haut, Ohren, Maulhöhle und die Anogenitalregion kontrolliert
- eine Palpation des Abdomens durchgeführt
- Herz und Lunge auskultiert.

3.1.2.3 Spezielle Untersuchungen

3.1.2.3.1 Harnuntersuchung

Harngewinnung:

Allen Tieren ohne Urolithiasis wurde durch Blasenkompression Harn entnommen. Zuvor wurde sichergestellt, daß keine Obstruktion der Urethra vorlag. Zwei verschiedene Methoden wurden eingesetzt.

METHODE 1:

- Die Tiere wurden mit der linken Hand kaudal der Vordergliedmaßen ventral am Brustkorb gegriffen und mit dem Rücken zum Untersucher an dessen Brustkorb gehalten. Dann wurde mit der rechten Hand die Blase palpirt und unter vorsichtigem Druck entleert (Abb.1).



Abb. 1: Harngewinnung mittels Methode 1

METHODE 2:

- Die Tiere wurden derart auf den rechten Unterarm des Untersuchers gelegt, daß der Kopf in der Ellenbogenbeuge zu liegen kam, alle Gliedmaßen seitlich am Arm lagen und sich das kaudale Abdomen des Tieres in der Handfläche des Untersuchers befand. Das Kaninchen wurde quer vor dem Körper des Untersuchers gehalten und mit dem linken Arm von oben fixiert, wobei die linke Hand die Ohren griff (Abb.2).



Abb. 2: Harngewinnung mittels Methode 2

Bei Kaninchen mit einer Urolithiasis wurde eine Zystozentese unter Isofluranarkose (mit Forene^R, Vol 3%) durchgeführt. Die Blasenpunktion erfolgte mit einer 0,55 x 25 mm Kanüle durch die Wand des ventralen Abdomens nach Scheren des

Fells und erfolgter Hautdesinfektion. Dabei wurde die Blase zwischen Daumen und Zeigefinger an der Abdomenwand fixiert. Innerhalb der nächsten 1,5 h erfolgte die Untersuchung der so gewonnene Probe (1,5-10 ml). Alle Untersuchungen (mit Ausnahme der mikrobiologischen Harnuntersuchung) wurden im Labor der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin durchgeführt.

Chemische und enzymatische Harnuntersuchung:

Diese wurde sofort im Anschluß an die Harngewinnung durchgeführt. Dafür wurde der Combur⁹-Test[®] der Firma Boehringer, Mannheim, verwendet. Das Eintauchen des Teststreifens erfolgte maximal 1 Sekunde lang in den gut durchmischten, frischen Harn. Danach wurde die seitliche Kante der gut benetzten Teststreifenfelder am Gefäßrand abgestrichen, um überschüssigen Harn zu entfernen. Nach 30-60 Sekunden (max. 120 Sekunden im Falle des Leukozytentestfeldes) wurden die Testbezirke mit der Farbskala des Etikettes verglichen.

Vergleich der chemischen/mikroskopischen Untersuchung von Erythrozyten und Leukozyten:

Die Firma Roche gibt folgende Protokollierung für den Combur⁹-Test[®] an, wobei sie auf die Ungenauigkeit der Umrechnung Kammerzählung in Zellen/Gesichtsfeld hinweist, da zu viele Faktoren einen Einfluß auf das Ergebnis besitzen.

Tabelle 1: Verknüpfung der Angaben zwischen Combur⁹-Test[®] und den mikroskopischen Ergebnissen

	ZELLEN (pro Gesichtsfeld bei 40-facher Vergr., ca. 0,3 µl)
(+)	0-1
+	1-5
++	6-15
+++	16-50
massenhaft	>50

Makroskopische Harnuntersuchung:

Beurteilt wurden:

- Farbe
- Geruch
- Viskosität
- Transparenz

Physikalische Harnuntersuchung:

Das spezifische Gewicht wurde mit Hilfe des Handrefraktometers Uricon N (Fa. Atago) ermittelt. Zuvor wurde 1,0 ml Urin mit einer sterilen Einmalspritze in ein steriles Reagenzröhrchen verbracht. Dort wurde der Harn noch einmal durchmischt. Ein Tropfen der Urinprobe wurde dann mit einer 1 ml Transferpipette (Fa. Sarstedt) auf die saubere, gereinigte Prismenoberfläche aufgebracht und durch Andrücken der Abdeckplatte gleichmäßig verteilt. Danach wurde der Wert direkt an der Skala, die einen Bereich von 1,000 bis 1,050 abdeckt, abgelesen. Jede Messung erfolgte doppelt.

Mikroskopische Harnuntersuchung:

Zuerst wurde ein Tropfen Urin mit einer 1ml Transferpipette (Fa. Sarstedt) auf einen Objektträger aufgetragen und dann mit einem Deckgläschen (18 mm x 18 mm) bedeckt. Mit einem Lichtmikroskop bei 100-facher Vergrößerung wurde das Präparat auf Auffälligkeiten durchgemustert. Danach wurden bei 400-facher Vergrößerung fünf Gesichtsfelder ausgezählt. Es wurden lediglich gut erkennbare Elemente einzeln gewertet. Dabei wurde folgendes Schema angewendet:

- 0-10 Elemente = +
- 11-30 Elemente = ++
- 31-50 Elemente = +++
- über 50 Elemente oder unzählbare kleine Kristalle = ++++

Bei amorphen Kristallen (Phosphaten) wurde eine Aufteilung in Gesichtsfelder gewählt:

- $<1/3$ GF = +
- $1/3$ GF = ++
- $2/3$ GF = +++
- 1 GF = ++++

Mit der Tischzentrifuge Laborfuge A (Fa. Heraeus Sepatech) wurde die Urinprobe bei 2000 U/min 5 Min zentrifugiert. Wenn der Überstand unauffällig erschien wurde er dekantiert, andernfalls wurde ein Tropfen des Überstandes mikroskopisch untersucht. Bei Entstehung deutlicher Sedimentschichten wurden diese zuerst im Mikroskop auf ihre Hauptbestandteile untersucht. Dann wurde das Sediment wieder durchmischt und unter dem Mikroskop in der gleichen Weise untersucht wie die unzentrifugierte Probe zuvor.

Bei fraglichen Bestandteilen (amorphe Phosphate, amorphe Urate) wurde die Probe im Wasserbad erwärmt, um die Löslichkeit der Elemente festzustellen.

Bakteriologische Untersuchung:

Bei 94 Tieren wurde eine bakteriologische Untersuchung des Harns durchgeführt. Es wurde ein Tupfer (BBL Culturette Becton Dickinson & Co) des frischen, unzentrifugierten Urins genommen. Proben wurden am selben Tag abgeholt und am Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen der Freien Universität Berlin untersucht. Neben einer Keimdifferenzierung erfolgte eine Resistenzbestimmung.

3.1.2.3.2 Blutuntersuchung

Bei allen Patienten wurde eine hämatologische und blutchemische Untersuchung durchgeführt.

Blutgewinnung:

Für die Blutentnahme wurde das Kaninchen auf dem Arm einer Hilfsperson fixiert und eine Hintergliedmaße durch Umfassen des Oberschenkels gestreckt. Dadurch wurde gleichzeitig die Vena saphena lateralis gestaut, aus welcher die Blutentnahme

erfolgen sollte.

Das Fell über der Entnahmestelle wurde gescheitelt oder geschoren und die Haut mit einem Alkoholtupfer (Isopropanol 70%) gereinigt und desinfiziert. Die Punktion erfolgte je nach Größe des Kaninchens mit einer 0,90 x 40 oder 0,70 x 30 mm Kanüle. Das Blut wurde in einem EDTA-Röhrchen (0,2-0,5 ml) und einem heparinisierten Röhrchen der Fa. Saarstedt (0,5-1,0 ml) aufgefangen.

Hämatologische und blutchemische Untersuchung:

Es wurden folgende Parameter untersucht:

⇒ Blutbild : Hämoglobin, Erythrozyten, Leukozyten, Hämatokrit, MCH, MCHC, MCV, Thrombozyten

⇒ Blutchemische Parameter: → Nierenwerte (Harnstoff, Kreatinin)

→ Leberwerte (GPT, GOT, GLDH, AP)

→ Elektrolyte (Kalzium, anorganisches Phosphor sowie Natrium und Kalium bei ausreichender Probenmenge)

→ Blutzucker

Als Gerät für die hämatologische Untersuchung stand das Cell-Dyn 35000 der Firma Abbott zur Verfügung. Für die blutchemische Untersuchung wurde, je nach Probenmenge, entweder das Reflotron (Boehringer Mannheim) oder das Cobas Mira der Firma Roche verwendet. Natrium und Kalium wurden mit Hilfe des Nova Electrolyte Analyzers 14+ der Firma Nova Biomedical bestimmt.

Die jeweiligen Blutwerte wurden nach folgender Tabelle eingeordnet.

Tabelle 2: Normwerte Kaninchen (EWRINGMANN und GÖBEL 1998)

Blutparameter	Normwerte
Hämoglobin (g/dl)	8,55 - 16,0
Erythrozyten (10e12/L)	4,45 - 7,82
Leukozyten (10e9/L)	2,56 - 9,87
Hämatokrit (%)	26,28 - 48,35
MCH (pg)	16,76 - 24,4
MCHC (g/dl)	27,14 - 38,34
MCV (fL)	53,5 - 73,93
Thrombozyten (10e9/L)	128,1 - 905,6
Natrium (mmol/l)	135,8 - 147,0
Kalium (mmol/l)	3,1 - 5,0
Kalzium (mmol/l)	2,4 - 4,2
Phosphor (mmol/l)	0,6 - 2,7
Harnstoff (mg/dl)	13,8 - 44,0
Kreatinin (mg/dl)	0,8 - 2,0
Glukose (mg/dl)	109,9 - 285,6
GPT (IU/l)	8,3 - 44,7
GOT (IU/l)	4,8 - 31,6
GLDH (IU/l)	0,6 - 8,4
AP (IU/l)	19,0 - 172,5

Serumgewinnung:

Nach Zentrifugation der Blutprobe des heparinisierten Röhrchens bei 4500 U/min über eine Dauer von 5 Minuten (*Minifuge RF*, Heraeus Sepatech) wurde das Serum in Eppendorfgefäße umgefüllt und bis zum Zeitpunkt der Untersuchung bei -20°C eingefroren.

Serologische Untersuchung:

92 Tiere wurden mit Hilfe des Tuschetests auf Antikörper gegen *Encephalitozoon cuniculi* untersucht. Der Tuschetest basiert darauf, daß sich Tuschepartikel an Immunglobulin G-Moleküle binden. Sollte das Serum Antikörper aufweisen, so würden sie dadurch sichtbar gemacht, daß die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe einen schwarzen Tuschekranz aufweisen.

Für die Durchführung des Tuschetests wurden das kommerziell erhältliche *Encephalitozoon cuniculi*-Antigen und die Tuschesuspension der Firma Testman (Box 9020, 75009 Uppsala, Schweden) verwendet.

Das bei + 4°C gelagerte Antigen sowie die eingelagerten Serumproben wurden vor der Untersuchung auf Zimmertemperatur erwärmt. Als Puffer wurde PBS verwendet (8,5 g NaCl, 8,3 g Na₂HPO₄·2H₂O, 2,7 g KH₂PO₄, 1000 ml Aqua dest., pH 7,2; Zimmertemperatur).

Die Durchführung basierte auf der modifizierten Methode von KELLET und BYWATER (1978).

380 µl PBS und 20 µl Serum wurden in einem Eppendorfgefäß vermischt. Mit Hilfe einer Einmal-Mikropipette wurden je 2 µl Antigensuspension, Serum-Verdünnung und Tuschesuspension auf einen Objektträger pipettiert, gut miteinander vermischt und mit einem Deckgläschen abgedeckt. Nach 5 Minuten erfolgte die Untersuchung der Reaktion bei 1000-facher Vergrößerung mit Ölimmersion unter einem Lichtmikroskop.

Als positiv wurde eine Probe beurteilt, wenn unter dem Mikroskop deutliche schwarze Tuschekränze zu sehen waren.

3.1.2.3.3 Röntgen

Lag der Verdacht einer Erkrankung mit Beteiligung der harnproduzierenden oder -ausscheidenden Organe vor (z.B. Gries- oder Steinbildung im Bereich der ableitenden Harnwege), so wurden Röntgenaufnahmen des Abdomens im latero-lateralen und ventro-dorsalen Strahlengang angefertigt.

Wurde das Tier auf Grund eines anderen Krankheitsgeschehens vorgestellt, bei dem eine diagnostische Abklärung mittels Röntgen notwendig war, so wurden die Ergebnisse bei Relevanz übernommen.

3.1.2.3.4 Pathologische Untersuchung

Mußten Tiere in der Klinik euthanasiert werden oder verstarben dort, so wurden sie bei Einverständnis des Besitzers im Institut für Veterinärpathologie der Freien Universität Berlin pathologisch histo-anatomisch untersucht.

3.1.2.3.5 Harnsteinanalyse

Die infrarotspektroskopische Harnsteinanalyse wurde im Institut für Tierernährung der Tierärztlichen Hochschule Hannover durchgeführt.