

Pferdeheilkunde

15. Jahrgang
Juli/August

4/99

Zur Diagnostik des Podotrochlose-Syndroms
in der Praxis

The Role of Tapeworms in Equine Colic

Möglichkeiten der Farbdopplerechokardiographie
und der Herzkatheteruntersuchung
zur Beurteilung der Hämodynamik eines
Ventrikelseptumdefektes/Fallbericht

Kolik durch Hernia inguinalis bei einem Wallach

Endotoxämie bei Kolikerkrankungen des Pferdes –
Quantitative Bestimmung und klinische Relevanz

Distale renale tubuläre Azidose bei einem
dreijährigen Warmblutwallach

Partielle Erektionsschwäche als Ursache einer
Ejakulationsstörung bei einem Warmbluthengst

hippiatrika

ISSN 0177-7726

Pferdeheilkunde

Endotoxämie bei Kolikerkrankungen des Pferdes – Quantitative Bestimmung und klinische Relevanz

A. Vidovic¹ und B. Huskamp²

¹ Tierärztliche Klinik Altforweiler und ² Tierklinik Hochmoor, Gescher Hochmoor

Zusammenfassung

Pferde als Pflanzenfresser benötigen für die Verdauungsvorgänge im Magen-Darm-Kanal eine Vielzahl von Mikroorganismen. In der Pathogenese der equinen Kolikerkrankungen spielen die aus einem Teil dieser Bakterien stammenden Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) eine wichtige Rolle. Das Caecum und das Colon ascendens scheinen der Ort einer pathologischen Endotoxinabsorption beim Pferd zu sein. Mit Hilfe von Limulus-Amoebocyten-Lysat-Tests (chromogenes Substrat, Endpunkt Methode) wurden die Endotoxinkonzentrationen bei 52 gesunden Pferden und 105 an Magen-Darm-Kolik erkrankten Pferde bestimmt. Durch wiederholte Messungen wurde die Entwicklung der Endotoxinkonzentration bei Kolikpferden im Krankheitsverlauf untersucht. Im Plasma aller gesunden Pferde wurden Endotoxine nachgewiesen, mit einem Mittelwert von $\bar{x} = 5,90 \text{ pg/ml} \pm 2,78 \text{ pg/ml}$. Bei 90,5% der Pferde mit Kolik lag die Endotoxinkonzentration in der ersten Probe nach Einlieferung in die Klinik über 10 pg/ml. Kolikformen mit grundsätzlich hohen Endotoxinkonzentrationen konnten herausgefunden werden. In dieser Untersuchung waren das die Hernia foraminis omentalis mit einem LPS-Mittelwert von 91,57 pg/ml, die Dünndarmstrangulation durch Lipoma pendulans mit einem LPS-Mittelwert von 89,32 pg/ml und die Torsio coli totalis 360° mit einem LPS-Mittelwert von 88,21 pg/ml.

Schlüsselwörter: Pferd, Kolik, Endotoxin, Lipopolysaccharide, Limulus-Amoebocyten-Lysat

Endotoxaemia in colic illnesses in horses – quantitative analysis and clinical relevance

Horses as herbivores require a multitude of micro-organisms for the digestive processes in the gastrointestinal tract. The endotoxins (lipopolysaccharides, LPS) originating from a part of the bacteria play an important role in the pathogenesis of equine colic illnesses. The caecum and the colon ascendens appear to be the site of a pathological absorption of endotoxins in horses. With the aid of limulus-amoebocyte-lysate tests (chromogeneous substrate, end-point method) the endotoxin concentrations were analysed in 52 healthy horses and 105 horses suffering from gastrointestinal colic. The development of the endotoxin concentration in the case of horses suffering from colic was investigated through repeated measurements throughout the course of the illness. Endotoxins were identified in the plasma of all healthy horses at a mean value of $\bar{x} = 5.90 \text{ pg/ml} \pm 2.78 \text{ pg/ml}$. In 90.5% of the horses with colic, the concentration of endotoxins in the first sample subsequent to admission to the clinic was over 10 pg/ml. It was possible to determine specific forms of colic accompanied by fundamentally high concentrations of endotoxins. In this investigation these were omental foramen hernia with a mean LPS value of 91.57 pg/ml, small intestinal strangulation by lipoma pendulans with a mean LPS value of 89.32 pg/ml and colon torsion 360° with a mean LPS value of 88.21 pg/ml.

keywords: horse, colic, endotoxin, lipopolysaccharides, limulus-amoebocyte-lysate

Einleitung

Der Begriff „Kolik“ umfasst eine Vielzahl der Bauchhöhlenerkrankungen des Pferdes, in deren Pathogenese unter anderem die bakteriellen Endotoxine (Lipopolysaccharide, LPS) eine Rolle spielen. Magen-Darm-Koliken führen, in Abhängigkeit von ihrer Art und Dauer, zu einer gestörten Blutversorgung der Darmwand (Ischämie), die eine Zerstörung der intakten Mukosabarriere hervorruft und dadurch eine Endotoxin-Translokation aus dem Darmlumen in die Blutbahn ermöglicht (Moore 1985). Üblicherweise wird die Endotoxämie beim Kolikpatient als Auslöser eines hypovolämischen Schocks betrachtet (Moore 1985; Morris 1987; Muir 1987; Rose und Wright 1991; Meister et al. 1992), der klinisch von einer Erhöhung der Herz- und Pulsfrequenzen, Kälte in der Peripherie, Zyanose der sichtbaren Schleimhäute, verminderter Kapillarfüllungszeit, sowie Oligurie oder sogar Anurie geprägt ist (Huskamp et al. 1982). Bei Strangulationskoliken werden die Endotoxine mit intraoperativen Komplikationen sowie mit hoher postoperativer Morbidität und Mortalität in Zusammenhang gebracht (Holland et al. 1986).

Endotoxinassoziierte Begleiterkrankungen, die sich aus Magen-Darm-Koliken entwickeln und denen in der Literatur eine große klinische Relevanz beigemessen wird, sind:

- Disseminierte intravasale Gerinnung (DIG, Verbrauchskoagulopathie) (Morris 1992; Morris und Beech 1983),
- Hufrehe (Moore et al. 1979; Sprouse et al. 1987; Stashak 1989; White II 1990; Cohen et al. 1994),
- Kolitis, Typhlokolitis (Rooney et al. 1966; Gao et al. 1988; Muray 1990; Pohlenz 1993; Weiss 1993),
- Postoperatives Auftreten von paralytischem Ileus (King und Gering 1991).

Die Angaben über die quantitative Anwesenheit der Endotoxine im Blut von Pferden mit Kolik sind in der Literatur immer noch spärlich. Die beschriebenen Nachweisverfahren sind meistens qualitativ oder semiquantitativ, und beschränken sich auf den Befund „endotoxin-positiv“ oder „endotoxin-negativ“. Ein direkter Vergleich von vorhandenen Studien ist ebenfalls schwierig, da sich die Extraktionsvorgänge und Testverfahren voneinander unterscheiden

(King und Gerring 1988). „Endotoxin-ähnliche“ Stoffe wurden erstmals durch Meyers et al. (1982) im Blut einiger Kolikpatienten nachgewiesen. Es handelte sich dabei um 43% der an Kolik erkrankten Pferde. King und Gerring (1988) konnten die LPS bei 27% der untersuchten Kolikpatienten nachweisen. Nach Moore (1991) kommt die Endotoxämie bei mindestens 25% der Pferde mit Kolik vor.

Die genauen Endotoxinkonzentrationen bei bestimmten endotoxinassoziierten Krankheitszuständen bei Mensch und Tier konnte man erst dann bestimmen, als vor wenigen Jahren der qualitative Limulus-Amoebocyten-Lysat-Test (LAL) zum Endotoxinnachweis zu einer quantitativen Methode weiterentwickelt wurde (Birk 1988; Dreist 1988; Van-Deventer 1988). Das Ziel unserer Untersuchung war, die Häufigkeit und das genaue Ausmaß einer Endotoxämie bei Pferden mit Magen-Darm-Kolik zu bestimmen. Der Grundgedanke war, eine Vorstellung zu gewinnen, inwieweit die Endotoxine am Krankheits- und Schockgeschehen des Kolikpatienten beteiligt sind. Außerdem war es im Hinblick auf eine gezielte antiendotoxische Therapie von klinischer Bedeutung, Kolikformen mit grundsätzlich hoher LPS-Absorption herauszufinden.

Material und Methodik

Das Probenmaterial dieser Untersuchung stammte von 105 Kolikpatienten und 52 klinisch gesunden Pferden. Die Entnahme der Blutproben erfolgte in der Tierklinik Hochmoor im Zeitraum vom März bis Oktober 1992.

Die Kolikpatienten wurden in zwei Gruppen eingeteilt:

1. Chirurgisch behandelte Pferde: In diese Gruppe wurden alle operativ behandelten Patienten aufgenommen. Sie enthält 80 Patienten, davon 50 überlebende und 30 verendete Pferde. Die erste Blutprobe wurde vor der Operation entnommen. Die 2., 3. und 4. Probe wurde 8, 16 und 40 h post operationem entnommen. Die Entnahme der 1. und 2. Probe erfolgte in jedem Fall, während die 3. und 4. Probe nur bei anhaltend schlechtem Allgemeinbefinden entnommen wurde.
2. Konservativ behandelte Pferde: 25 Patienten, davon 18 überlebende und 7 verendete Pferde. In diese Gruppe gehören nur Patienten mit gestörtem Allgemeinbefinden, bei denen zunächst eine operative Indikation zweifelhaft war, oder eine Operation ausdrücklich nicht genehmigt wurde. Kolikpatienten mit spastischer Kolik, Tympanie oder primärer Dickdarmverstopfung, die ein ungestörtes Allgemeinbefinden aufwiesen, wurden in der Untersuchung nicht berücksichtigt. Die erste Blutprobe wurde nach der Eingangsuntersuchung entnommen. Die Entnahme der 2. Probe erfolgte bei anhaltend gestörtem Allgemeinbefinden 8 h später.

Von den klinisch gesunden Pferden (Kontrollgruppe) wurde unabhängig von der Tageszeit und Fütterung jeweils nur eine Probe entnommen (Tab. 1).

Bei der Endotoxinbestimmung wurde sowohl bei der Probengewinnung als auch bei der Probenauswertung streng auf eine pyrogenfreie Technik geachtet. Die Blutentnahme

erfolgte aus der V. jugularis oder aus der V. thoracica superficialis. Die Punktionsstelle wurde vorher rasiert und mit Alkohol und Jod desinfiziert. Bei der Probengewinnung wurde die Vakuumtechnik der Firma Becton Dickinson Vacutainer Systems „Vacutainer“ verwendet (Vakuumröhrchen 7 ml, mit Lithium Heparin 143 Einheiten U.S.P. und Doppelkanüle 1,2 x 40 mm). Die Blutproben wurden anschließend 15 min lang bei 3.000 U/min zentrifugiert. Das gewonnene thrombozythenarme Plasma wurde bis zum Tag der Auswertung bei -25°C gelagert.

Tab. 1. Beteiligung der verschiedenen Kolikursachen bei konservativ und operativ behandelten Pferden sowie bei der gesamten Patientengruppe mit der Anzahl der überlebenden (Ü) und der verendeten (V) Patienten

Incidence of the different causes of colic in horses treated conservatively and surgically and in all colic patients, plus the number of patients that survived (Ü) and the number that died (V)

Erkrankung	Behandlungsart		insgesamt n
	konservativ n	operativ n	
Dünndarm	9 Ü: 6 V: 3	34 Ü: 24 V: 10	43 Ü: 30 V: 13
Dickdarm	13 Ü: 12 V: 1	36 Ü: 22 V: 14	49 Ü: 34 V: 15
Dünndarm und Dickdarm kombiniert	— Ü: — V: —	5 Ü: 4 V: 1	5 Ü: 4 V: 1
Rupturen	1 Ü: — V: 1	3 Ü: — V: 3	4 Ü: — V: 4
primäre Peritonitis	— Ü: — V: —	2 Ü: — V: 2	2 Ü: — V: 2
Übrige *	2 Ü: — V: 2	— Ü: — V: —	2 Ü: — V: 2
insgesamt	25 Ü: 18 V: 7	80 Ü: 50 V: 30	105 Ü: 68 V: 37

* Als „Übrige“ wurden zwei konservativ behandelte Pferde bezeichnet, die bei der Ankunft und während der Behandlung deutliche Koliksymptome zeigten, deren Ursache jedoch keine Magen-Darm-Erkrankung war.

Als klinische Parameter, die den Zustand des Patienten annähernd objektiv anzeigen und die durch den Einfluß der Endotoxine eine Abweichung erfahren, wurden Puls, Atmung und innere Körpertemperatur bestimmt. Die Laborparameter Hämatokrit, Plasma-Gesamtprotein, Blutgase, Elektrolyte, Fibrinogen und die für das Pferd leberspezifischen Enzyme SDH und GLDH dienten zur Ergänzung der klinischen Untersuchung.

Quantitative Endotoxinbestimmung

Der quantitative Endotoxinnachweis erfolgte mit dem Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL)-Test mit chromogenem Substrat. Das für die Zwecke dieser Untersuchung zur Verfügung stehende „FP-900 analyser system“ bestand aus einem 9-Kanal-Photometer „FP-901 Chemistry Analyser“, Inkubator „FP-401“ und Pipettierungssystem „FP-900“ (Labsystems Oy, Pultitie 8, P.O.Box 8, 00881 Helsinki, Finnland). Das Test-Simplet COATEST® Endotoxin CH-B: X0016-51 (Chromogenix AB, Taljegardsgatan 3, S-431 53 Mölndal, Sweden) zur quantitativen Bestimmung von Endotoxin in Plasma enthält folgende Reagenzien:

Reagenz:		CH.-B:
1 x S-2423 Lyophilisiertes chromogenes Substrat (Ac-Ile-Glu-Gly-Arg-pNA-HCL) mit Mannitol als Füllstoff	10 mg	93619-51
5 x Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL)	23 mg	29357-51
1 x Puffer (0,05 mol/l Tris, pH 9,0)	10 ml	93513-54
1 x Endotoxinfreies Wasser	50 ml	29249-51
2 x Endotoxin (E. coli 0111:B4) in Humanalbumin		29238-52

Dieser Endotoxinstandard wurde gegen den FDA-Standard EC-5 lot F und den WHO-Standard 84/650 kalibriert. Ein Fläschchen aus dem Test-Simplet enthält 21,6 EU (12 EU = 1 ng) lyophilisiertes Endotoxin.

Herstellung der Reaktionsansätze

Alle Reagenzien und das Plasma wurden vor dem Auflösen bzw. Verdünnen auf Raumtemperatur gebracht. Zur Erstellung einer Standardkurve ist der Endotoxin-Standard E. coli 0111:B4, 21,6 EU/Flasche mit 1,80 ml sterilem, endotoxinfreiem Wasser gelöst und mit einem Vortexmixer 3 min geschüttelt worden. Somit wurde eine Konzentration von 12,0 EU/ml hergestellt. Das Lysat wurde mit 1,40 ml sterilem, endotoxinfreiem Wasser aufgelöst und vorsichtig geschüttelt, um eine Schaumbildung zu vermeiden. Nach mindestens 10minütigem Stehen bei Raumtemperatur war die Lösung gebrauchsfertig. Das S-2423-Substrat wurde mit 7,20 ml endotoxinfreiem Wasser zu einer Konzentration von 2 mmol/l aufgelöst. Die gleiche Menge von S-2423-Substratlösung und Puffer wurde gemischt und auf 37°C erwärmt.

Reaktionsprinzip

Gramnegatives bakterielles Endotoxin aktiviert das Proenzym im Limulus-Amoebocyten-Lysat (LAL). Das gebildete Enzym spaltet p-Nitroanilin (pNA) von chromogenem Substrat S-2423 ab. Die pNA-Freisetzung wird photometrisch bei 405 nm Wellenlänge entweder nach dem Abstoppen der Reaktion mit Essigsäure (Endpunktmethod) oder kontinuierlich (Kinetikmethod) gemessen. Die Korrelation zwischen Endotoxinkonzentration und Freisetzung von pNA

läßt eine quantitative Aussage zu. Die Nachweisgrenze dieses Verfahrens liegt bei einem Wert von 1 pg Endotoxin/ml Plasma.

Standardisierung

Zur Erstellung einer Standardkurve diente das Plasma eines klinisch gesunden Pferdes, dem eine bekannte Menge von Endotoxin zugegeben wurde. Es wurden 5 Standard-Verdünnungen von Endotoxin mit Plasma nach folgendem Vorgang angefertigt:

Standard	endotoxinfreies Wasser	Pferdeplasma	Endotoxinlösung	Standards EU/ml Plasma
	(µl)	(µl)	1,2 EU/ml	
1	1800	200	0	Leerwert
2	1790	200	10	0,06
3	1775	200	25	0,15
4	1750	200	50	0,3
5	1700	200	100	0,6

- die Endotoxin Stammlösung (12 EU/ml) wurde 1:10 auf 1,2 EU/ml verdünnt.
- die Standards sind unmittelbar nach der Herstellung 5 min im Wasserbad bei 75°C hitzebehandelt worden. Danach waren sie 24 Stunden bei 2–8°C stabil.
- jede Standardverdünnung wurde bei Erstellung der Standardkurve doppelt gemessen.

Probenbehandlung

Die Plasmaproben zur Endotoxinbestimmung wurden auf Raumtemperatur gebracht. Danach erfolgte ein einminütiges Schütteln im Vortexmixer. Anschließend wurde das Plasma im Verhältnis 1:10 mit pyrogenfreiem Wasser in Schraubgläschen verdünnt und für 5 min bei 75°C im Wasserbad hitzebehandelt. Die behandelten Proben waren 24 Stunden bei 2–8°C stabil. Um die Gefahr eines vogetäuschten positiven Ergebnisses auszuschließen, speziell bei milchgrüben oder hämolytischen Proben, wurde der Absorptionskoeffizient für jede Plasmaprobe ohne Zugabe der Reagenzien gemessen (sogenannte „Blankprobe“).

Beschickung der Mikroküvette

Für die Untersuchung wurden sterile, pyrogenfreie Mikroküvetten mit 9 Kavitäten bzw. Vertiefungen (3 Zeilen und 3 Spalten) benötigt („FP-900“ Labsystems Oy). Drei Kavitäten einer Spalte sind mit gleichem Standard bzw. Plasmaprobe belegt worden, so daß in einer Mikroküvette immer gleichzeitig 3 Standards oder Plasmaproben getestet werden konnten. Die ersten zwei Kavitäten der Zeile dienten der Endotoxinmessung (Doppeltbestimmung), und in der dritten Kavität wurde die Blankprobe gemessen.

Zugabe der Reaktionsansätze in die Mikroküvettenvertiefung

- | | |
|--|--------|
| 1. Standard o. Plasmaprobe (20–25°C) | 50 µl |
| inkubiert bei 37°C 5 min | |
| 2. LAL Lösung (37°C) | 50 µl |
| gemixt und inkubiert bei 37°C genau 30 min | |
| 3. Substrat-Pufferlösung (37°C) | 100 µl |
| gemixt und inkubiert bei 37°C genau 10 min | |
| 4. Essigsäure 20% sofort gemixt | 100 µl |

Nach Zugabe von LAL in die erste Mikroküvettenvertiefung ist eine streng konstante Zeitfolge eingehalten worden. Beim Pipettieren wurde auf eine konstante Geschwindigkeit geachtet (Verwendung der Repetierpipette). Nach Zugabe von Essigsäure waren die Proben innerhalb von 4 Stunden stabil. Die Messung des Absorptionskoeffizienten (OD-optical density) erfolgte allerdings 5–10 min nach dem Abstoppen der Reaktion im Photometer bei 405 nm Wellenlänge. Für die „Blankprobe“ wurden der 50 µl Standard- oder Plasmaprobe 150 µl Wasser und 100 µl Essigsäure zugegeben. Nach dem Ablesen der Absorptionskoeffizienten (OD) einer Mikroküvette wurde vom OD-Wert jeder Plasmaprobe oder jedes Standards der OD-Wert der „Blankprobe“ abgezogen:

$$OD = OD_{S/P} - OD_B$$

Die Plasmaproben hatten manchmal höhere OD-Werte als der OD-Wert des Standards mit der höchsten Endotoxin-konzentration, d.h. der OD-Wert der Plasmaprobe lag außerhalb des Bereiches der Standardkurve. In solchen Fällen wurde die vorbereitete Plasmaprobe zusätzlich 1:2 (auf 1:20) verdünnt und neugemessen.

Erstellung der Standardkurve

Für die Erstellung einer Standardkurve wurde ein PC mit Graphikprogramm genutzt. Anhand der bekannten zugegebenen Endotoxinmengen (Werte der y-Achse) und gemessenen OD (Werte der x-Achse) wurde die Standardkurve in linearer Darstellung ermittelt. Die Standardkurve zeigte für die zugegebene Endotoxinmenge im Bereich von 0,06 bis 0,6 EU/ml immer einen linearen Verlauf mit dem r-Koeffizient bis annähernd 1. Allerdings hat sich gezeigt, daß erst die zugegebene Endotoxinmenge von mehr als 1,8 EU/ml eine Standardkurve ergibt, die im oberen Bereich eine Abweichung zeigt bzw. nicht mehr linear ist. Diese Standardkurve läßt sich mathematisch durch die Gleichung $y = Ax + B$ ausdrücken (A = Steigung der Geraden; B = Schnittpunkt mit der x-Achse; y = zugefügte Endotoxinmenge; x = Gemessener Absorptionskoeffizient (OD)). Da x und y bekannte Werte sind, lassen sich die Konstanten A bzw. B bestimmen (das Berechnen dieser Werte erfolgte durch den Computer). Die unbekanntes Endotoxin-konzentration der Plasmaprobe in EU/ml ließ sich dadurch ermitteln, daß der Absorptionskoeffizient der Plasmaprobe als x-Wert gesetzt wurde. Da die Plasmaproben doppelt gemessen wurden, ist für die Auswertung ein OD-Mittelwert ge-

nommen worden. Zum Schluß wurden die ermittelten Endotoxin-konzentrationen aus den EU/ml-Einheiten in pg/ml-Einheiten nach der Gleichung $12 \text{ EU/ml} = 1000 \text{ pg/ml}$ umgerechnet. Die Endotoxinbestimmung wurde im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Tierärztlichen Hochschule Helsinki, Finland unter wissenschaftlichen Betreuung von Prof. Dr. Markus Sandholm durchgeführt. Die Leberenzym- und die Fibrinogenbestimmung erfolgte im Zentrallabor der Tierärztlichen Hochschule Helsinki, und im „Finnish Red Cross Blood Transfusion Laboratory“ in Helsinki. Die Unterschiede zwischen den Meßwerten der verschiedenen Gruppen sind über eine Berechnung der Differenzsignifikanz mittels Mann-Whitney U-Test geprüft worden. Die Beziehungen zwischen Endotoxin-konzentration und Puls- und Atmungsfrequenz, innerer Körpertemperatur, Hämatokrit, Plasma-Gesamtprotein, Fibrinogen, SDH, GLDH, Anion gap, Bikarbonat, Kalium, Natrium und Chlorid sowie Fibrinogen und den Parametern SDH und GLDH wurden bei Kolikpatienten für jede einzelne Probe durch eine Berechnung des Pearson-Korrelationskoeffizienten (PKK) getestet.

Ergebnisse*Vergleich der Ergebnisse der klinisch gesunden Pferde und der Pferde mit Kolik*

Der Wertebereich für die Parameter Endotoxin-konzentration, Puls, Atmung, Hämatokrit, SDH und GLDH sowie Anion gap liegt bei den Pferden mit Kolik höher als bei der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu sind die Fibrinogen-konzentration, Kalium und Chlorid bei gesunden Pferden höher. Diese Unterschiede sind statistisch sehr hoch signifikant ($p < 0,001$). Weiterhin unterscheidet sich die Kontrollgruppe von den Kolikpatienten durch die niedrigere Plasma-Gesamtproteinkonzentration und den höheren pH-Wert. Im Hinblick auf diese Werte ist der Unterschied statistisch signifikant ($p < 0,05$).

In den Parametern innere Körpertemperatur, Base Excess, Bikarbonat und Natrium unterscheiden sich die gesunden Pferde von den Kolikpatienten statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$).

*Endotoxin**Endotoxine bei gesunden Pferden (Kontrollgruppe)*

Im Plasma aller gesunden Pferde ($n=52$) sind Endotoxine nachgewiesen worden. Der Mittelwert für Endotoxin-konzentration betrug $\bar{x} = 5,90 \text{ pg/ml}$ mit einer Standardabweichung von $2,78 \text{ pg/ml}$ (Abb. 1).

Endotoxine bei Pferden mit Kolik

Im Plasma aller Pferde mit Kolik wurden Endotoxine nachgewiesen. Mit nur wenigen Ausnahmen nahm dieser Endotoxinspiegel von der ersten bis zur vierten Probe ab. Bei 90,5% der Pferde mit Kolik befand sich die Endotoxin-konzentration in der ersten Probe mit über 10 pg/ml hoch sig-

nifikant höher ($p < 0,001$) als die durchschnittliche Endotoxinkonzentration der Kontrollgruppe ($\bar{x} = 5,90 \text{ pg/ml}$).

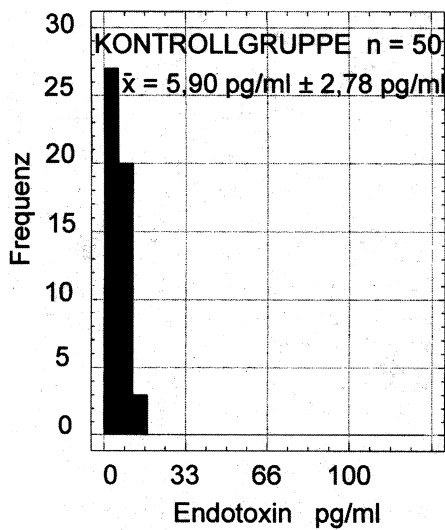


Abb. 1: Frequenz-Histogramm der Endotoxinkonzentration bei Pferden der Kontrollgruppe.

Frequency histogram of endotoxin concentrations in horses from the control group.

Die Abbildungen 2a,b und 3a bis 3d zeigen in Form eines Frequenz-Histogramms die Dynamik der Endotoxämie im Krankheitsverlauf bei konservativ behandelten Patienten (zwei Proben) und bei chirurgisch behandelten Patienten (vier Proben).

Der Mittelwert der Endotoxinkonzentrationen bei sämtlichen Pferden mit Kolik betrug in der ersten Probe $\bar{x} = 65,90 \pm 29,90 \text{ pg/ml}$. In der 2. und der 3. Probe zeigte die durchschnittliche Endotoxinkonzentration eine abnehmende Tendenz. So betrug die LPS-Konzentration für die 2. Probe $\bar{x} = 48,46 \pm 25,03 \text{ pg/ml}$, für die 3. $\bar{x} = 34,73 \pm 20,97 \text{ pg/ml}$ und für die 4. Probe $\bar{x} = 38,16 \pm 11,99 \text{ pg/ml}$. Die Anzahl der Proben von der 1. bis 4. betrug $n = 105$, $n = 67$, $n = 46$ und $n = 10$ (Abb. 4a). Die Endotoxinmessung bei Kolikpatienten ergab, daß ein Strangulationsileus als schwerste Kolikform gleichzeitig eine sehr hohe Endotoxinabsorption ermöglicht. In dieser Untersuchung waren das:

- Hernia foraminis omentalis (LPS-Mittelwert = $91,57 \text{ pg/ml}$, $n = 4$ Patienten),
- Dünndarmstrangulation durch Lipoma pendulans (LPS-Mittelwert = $89,32 \text{ pg/ml}$, $n = 3$ Patienten)
- Torsio coli totalis 360° (LPS-Mittelwert = $88,21 \text{ pg/ml}$, $n = 10$ Patienten)

Bei den Typhlokolitispatienten ($n = 6$) wurden keine sehr hohen Endotoxinwerte nachgewiesen. Der durchschnittliche Endotoxinspiegel dieser Patienten für die 1. Probe entsprach mit $\bar{x} = 66,02 \text{ pg/ml}$ fast exakt dem Durchschnittswert aller Kolikpatienten $\bar{x} = 65,90 \text{ pg/ml}$.

Die statistische Auswertung der Höhe der gemessenen LPS-Konzentrationen in der ersten Probe zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen konservativ und operativ behandelten Pferden ($p < 0,5$), sowie zwischen überlebenden und verendeten Patienten ($p > 0,5$). Darüber hinaus

zeigte die Korrelationsanalyse zwischen Endotoxinkonzentration und den anderen gemessenen Parametern keine signifikanten Zusammenhänge ($p > 0,1$). Nur die Korrelation mit der Fibrinogenkonzentration war in der 1. Probe hoch signifikant negativ ($PKK = -0,324$, $p < 0,001$).

Fibrinogen

Fibrinogen ist als Gerinnungsfaktor bei einer disseminierten intravasalen Gerinnung (Verbrauchskoagulopathie) beteiligt, spielt aber auch als „Akute-Phase-Reaktant“ eine Rolle in der „Akute-Phase-Antwort“ der Leber. Da die Lipopolysaccharide beim Kolikpatient beide Reaktionen auszulösen vermögen, war es sinnvoll zu ermitteln, wie sich die Fibrinogenkonzentration im Laufe einer Kolikerkrankung verändert. Die durchschnittliche Fibrinogenkonzentration bei Kolikpatienten war in der ersten Probe, im Gegensatz zur

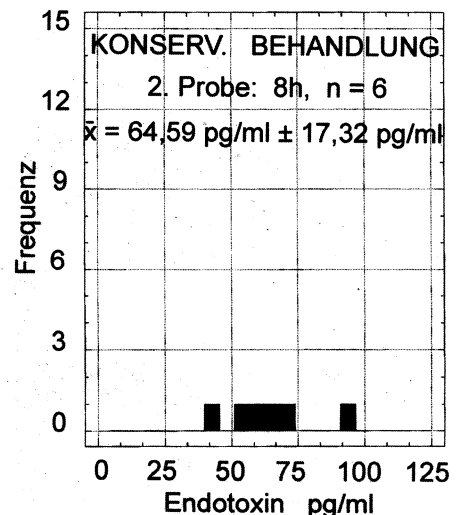
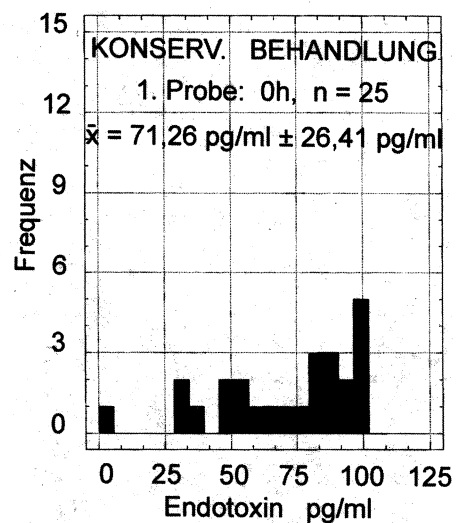


Abb. 2a, b: Frequenz-Histogramm der Endotoxinkonzentration in der ersten Probe (Abb. 2a) und 8 Stunden später in der zweiten Probe (Abb. 2b) bei konservativ behandelten Patienten.

Frequency histogram of endotoxin concentrations in the first sample (2a) and 8 hours later in the second sample (2b) in patients treated conservatively.

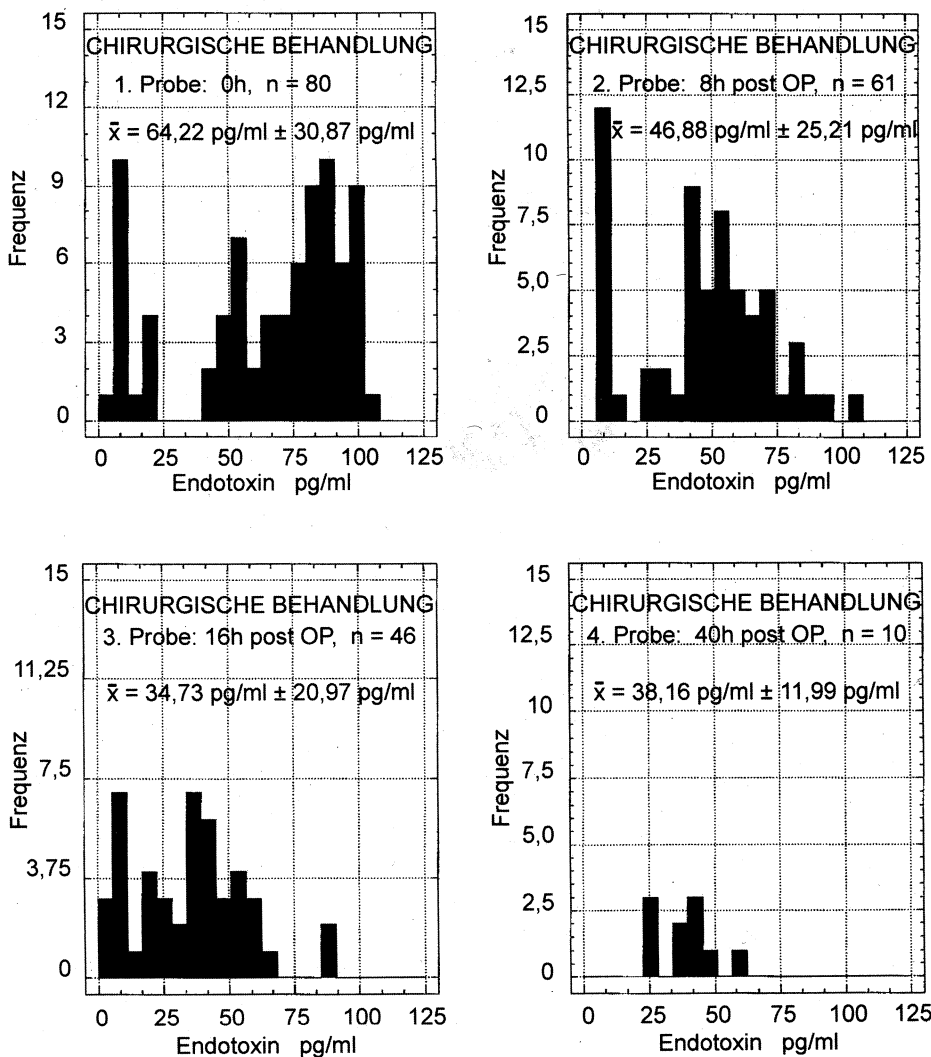


Abb. 3a bis 3d: Dynamik der Endotoxämie bei chirurgisch behandelten Patienten. Abb. 3a zeigt die Werte der ersten Probe (Entnahme vor operativem Eingriff), Abb. 3b die Werte der zweiten Probe (8 Stunden post operationem), Abb. 3c die Werte der dritten Probe (16 Stunden post operationem) und Abb. 3d die Werte der vierten Probe (40 Stunden post operationem).

Dynamics of endotoxaemia in patients treated surgically. Illustration 3a shows the values of the first sample (taken prior to surgery), 3b shows the values of the second sample (8 hours postoperative), 3c shows the values of the third sample (16 hours postoperative) and 3d shows the values of the fourth sample (40 hours postoperative).

Endotoxinkonzentration, deutlich geringer als die durchschnittliche Fibrinogenkonzentration der gesunden Pferde $\bar{x} = 3,98 \pm 1,03 \text{ g/l}$ ($n = 51$). Für die erste Probe sämtlicher Kolikpatienten betrug der Mittelwert $\bar{x} = 3,47 \pm 1,35 \text{ g/l}$, für die zweite $\bar{x} = 3,39 \pm 0,97 \text{ g/l}$, für die dritte $\bar{x} = 3,99 \pm 1,00 \text{ g/l}$ und für die vierte Probe $\bar{x} = 5,66 \pm 1,63 \text{ g/l}$. Die Anzahl der Proben von der ersten bis vierten betrug $n = 105$, $n = 68$, $n = 46$ und $n = 10$ (Abb. 4b).

Aufgrund der Entwicklung der Fibrinogenkonzentration bei Kolikpatienten läßt sich schließen, daß am Anfang der Kolikerkrankung (bis zu 16 Stunden nach dem Beginn der klinischen Behandlung) ein Fibrinogenverbrauch überwiegt, danach aber eine Hyperproduktion im Rahmen der „Akute-Phase-Antwort“ der Leber erfolgt.

Leberenzyme

Die Enzyme SDH und GLDH wurden als Zeichen einer durch LPS gestörten Leberfunktion gemessen. Die chirurgisch behandelten Pferde hatten signifikant höhere SDH- und GLDH-Werte als die konservativ behandelten ($p < 0,05$). Die SDH-Werte der verendeten Pferde waren

hoch signifikant höher als die der überlebenden Patienten ($p < 0,001$).

Diskussion

Pferde als Pflanzenfresser benötigen für die Verdauungsvorgänge im Magen-Darm-Kanal eine Vielzahl der Mikroorganismen. Wenn durch eine gestörte Blutversorgung der Darmwand, wie bei schweren Kolikerkrankungen, die intakte Mukosabarriere zerstört wird, kommt es zu einer verstärkten LPS-Absorption aus dem Darmtrakt und zum Auftreten einer Endotoxämie und/oder einer Septikämie (Latimer 1991; Kamphues 1992). Caecum und Colon ascendens gelten als Hauptlokalisationen einer pathologischen Endotoxinabsorption beim Pferd. So wird das Caecum der Pferde in klinischen Fällen eines endotoxischen Schocks als Ort der Absorption der Endotoxine angesehen. Beim normalen adulten Pferd wird in der Literatur eine LPS-Menge von $90 \mu\text{g/ml}$ Blinddarminhalt angegeben (Moore et al. 1981). In der vorliegenden Untersuchung wurden die höchsten Endotoxinkonzentrationen bei Kolikpatienten mit Dünn Darmstrangulationen gemessen, obschon der Blind-

darm und das große Kolon am pathologischen Bauchhöhlensitus nicht beteiligt waren.

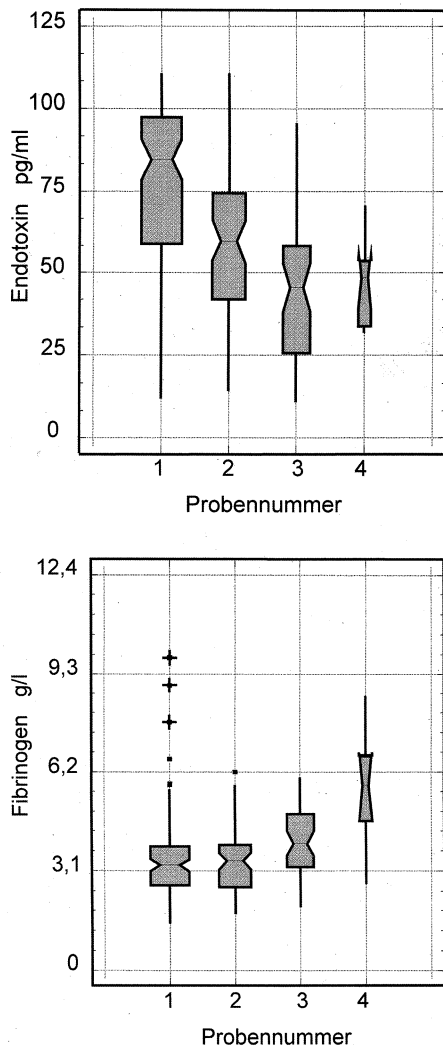


Abb. 4a, b: Plot-Box-Diagramme der Endotoxinkonzentration (Abb. 4a) und der Fibrinogenkonzentration (Abb. 4b) für die einzelnen Proben von sämtlichen Pferden mit Magen-Darm-Kolik.

Plot-box-diagrams of endotoxin concentrations (4a) and fibrinogen concentrations (4b) for the individual samples of all horses with gastrointestinal colic.

Die Ergebnisse der Endotoxinbestimmung bestätigen eindeutig die Annahme von *Burrows* (1981), daß die LPS bei gesunden Pferden schon physiologischerweise aus dem Darmlumen resorbiert und durch die Leber entgiftet werden. *Rietschel et al.* (1993) bezeichnen die Endotoxine in diesem Zusammenhang als „vitaminartige“ Stoffe für das Immunsystem. Welche physiologischen Mechanismen diese offensichtlich in engen Grenzen stattfindende Absorption bestimmen, bleibt in dieser Untersuchung ungeklärt. Im Vergleich zu Pferden können Endotoxine trotz des extrem empfindlichen LAL-Testverfahrens im Plasma von gesunden Menschen nicht nachgewiesen werden (*Mitzner* 1993). Eine Endotoxinkonzentration, die über der Nachweisgrenze von 1 pg/ml Plasma liegt, wird schon als auffällig betrachtet (*Becker* 1992), während eine Konzentration

von > 5 pg/ml Plasma als Zeichen für eine Septikämie durch gramnegative Bakterien gilt (*Hurley* 1992).

Unter dem Begriff Endotoxämie versteht man die Anwesenheit von Lipopolysacchariden, unabhängig von ihrer Menge im Blut. Da bei den gesunden Pferden die Lipopolysaccharide offenbar ein physiologischer Bestandteil des Blutes sind, wäre es falsch, die Tiere deswegen als endotoxämisch zu bezeichnen. So sollte in Zukunft beim Pferd zwischen einer physiologischen und einer pathologischen Endotoxämie unterschieden werden.

Die Plasma-Endotoxinkonzentration ist als Parameter, der das Allgemeinbefinden des Patienten objektiv bezeichnen soll, unzuverlässig. Magen-Darm-Koliken beim Pferd sind Erkrankungen mit einer multifaktoriellen Ätiologie. Der Zustand des Patienten bei der klinischen Aufnahme wird durch Art und Dauer der primären Erkrankung bestimmt und ändert sich unter dem Einfluß der eingeleiteten, zum Teil sehr umfangreichen und vielseitigen Behandlung ständig. Endotoxine sind dabei nur einer von vielen Faktoren, die den aktuellen Zustand des Patienten bestimmen. Schon deshalb ist es nicht möglich, nur aufgrund der bei einer mehr oder weniger zufälligen Probenentnahme gemessenen Endotoxinkonzentration eine ständig gültige Regel für den Zustand des Patienten herauszufinden, zumal auch bei gesunden Pferden ein physiologischer Endotoxingehalt gemessen werden kann.

Der Endotoxinspiegel ist als prognostischer Parameter für Überleben oder Tod bei den Patienten in dieser Untersuchung ebenfalls nicht zu verwenden. Denn bei 65% der verendeten Patienten war der Tod die Folge der gravierenden Grunderkrankung bzw. Folge der Komplikationen, die aus ihr ohne direkte Endotoxinwirkung entstanden (z. B. Organrupturen, Peritonitis oder Darmnekrose nach Retorsion/Reposition). Von insgesamt 37 verendeten Patienten sind 12 (32,5%) wegen eines inoperablen Bauchhöhlensitus und 12 wegen einer Komplikation eingegangen. Bei diesen Patienten ließen sich Tachykardie, erhöhte innere Körpertemperatur, sowie Dehydratation mit Elektrolyt- und Eiweißverlust eher auf die Komplikationen, als auf die Endotoxinwirkung zurückführen. Dafür spricht die Beobachtung, daß die Endotoxämie auch bei solchen Patienten eine abnehmende Tendenz aufwies. Bei Typhlokolitispatienten wurden wieder erwarten nur „durchschnittliche“ Endotoxinkonzentrationen gemessen. Hierbei sind folgende Aspekte zu berücksichtigen:

1. Diese Patienten hatten bei der Eingangsuntersuchung schon eine klinisch manifeste Typhlokolitis. Die aus der ersten Blutprobe gemessene Endotoxinkonzentration repräsentiert nicht mehr den ursprünglich hohen Spiegel, weil bereits ein Großteil wegen der kurzen Halbwertszeit eliminiert worden sein dürfte.
2. Bei einer Typhlokolitis findet eine enorme Wasseraus-schüttung aus den Blutgefäßen der Darmwand statt, während die Resorption ganz ausfällt. Dadurch wird der Kontakt der Endotoxine mit der Darmschleimhaut mechanisch verhindert; sie werden abgespült.
3. Bei einer nekrotisierenden Typhlokolitis kann die Bildung von Pseudomembranen zusätzlich den Kontakt der Endotoxine mit der Mukosa verhindern.

4. Allen Typhlokolitispatienten wurden Peristaltika (Konstigmin) verabreicht, was eine wesentlich kürzere Exposition der Kolonmukosa gegenüber endotoxinhaltigem Darminhalt bewirken könnte. Da die für eine Absorption zur Verfügung stehende Fläche des Mastdarms im Vergleich zum Kolon relativ klein und die Ingestapassage schneller ist, ist die absorbierte Endotoxinmenge entsprechend geringer.

Diese Untersuchung hat u.a. auch gezeigt, daß es einen entscheidenden Unterschied zwischen einer „endogenen“ Endotoxämie (wie sie z. B. beim Kolikpferd entsteht) und einer künstlich ausgelösten gibt, wie sie bei einer parenteralen Endotoxinverabreichung auftritt. Die endogene Endotoxämie verursachte zum einen keine Fieberreaktion und zum andern hatten die meisten Patienten trotz extrem hoher Endotoxinkonzentrationen im Blut keine oder nur dezente klinische Anzeichen einer Endotoxämie. Dies würde mit der Auffassung von *Burrows (1979)* übereinstimmen, daß ein langsam ansteigender Endotoxinpiegel im Blut (vermutlich wie bei Kolikpatienten) zu einer Toleranz seitens des Organismus bzw. zu einer Abschwächung der Symptome führt.

Ein Großteil der Kolikpatienten – 90,5% (konservativ und chirurgisch) – ist als pathologisch endotoxämisch zu bezeichnen. Dies übertrifft alle bisherige Angaben aus der Literatur (*Meyers et al. 1982; King und Gering 1988; Moore 1991*). Endotoxämie ist, wenn auch mit abnehmender Tendenz, bei manchen Patienten auch 48 h nach Beginn der Behandlung noch deutlich vorhanden. Bedenkt man dabei, daß durch enorm hohe Klärungskapazität der Pferdeleber die Halbwertszeit für die Endotoxine im Kreislauf weniger als 2 Minuten beträgt (*Moore 1988*), bedeutet das, daß Endotoxine kontinuierlich in den Kreislauf des Patienten gelangen müssen, um messbar hohe Konzentrationen zu erreichen.

Für die Bekämpfung der pathologischen Endotoxämie bei Pferden mit Kolik sind zwei Anhaltspunkte zu beachten.

1. Die Endotoxämie kommt niemals als ein primäres Krankheitsgeschehen vor, sondern erscheint sekundär, im Anschluß an andere vorausgehende Krankheiten (*Moore 1988*).
2. Pferde sind hinsichtlich einer Endotoxämie nicht sehr empfindlich. Sie sind in der Lage, die Endotoxine schnell aus dem Kreislauf zu eliminieren.

Hieraus ergeben sich folgende therapeutische Empfehlungen.

1. Eine rechtzeitige und konsequente Behandlung der primären Magen-Darm-Erkrankung ist unerlässlich. Dadurch soll auch die pathologische Endotoxinabsorption aus dem Darmlumen auf ein Mindestmaß gesenkt werden. Die Elimination der im Blut bereits vorhandenen Endotoxine übernimmt die Leber. Unter diesem Aspekt spielt die antiendotoxische Therapie durch Immunsrum bei den adulten Kolikpatienten eine untergeordnete Rolle, sie ist sogar überflüssig. Der Mittelwert der Endotoxinkonzentration für die 2. Probe bei chirurgisch behandelten Patienten $\bar{x} = 46,88$ pg/ml (trotz erheblicher Belastung durch den OP-Eingriff) liegt wesentlich

niedriger als der Mittelwert der 2. Probe der konservativ behandelten Patienten $\bar{x} = 64,59$ pg/ml, bei denen die Kolikursache nicht so schnell und radikal beseitigt werden konnte.

2. Die klinisch relevanten hämodynamischen und hämostatischen Anomalien, die bei Kolikpatienten auch durch systemische Endotoxinwirkung ausgelöst werden, sind ein hypovolämischer Schock mit Störungen der Mikrozirkulation und der Gewebepfusion und eine Verbrauchskoagulopathie. Öfter sind diese Anomalien zum Zeitpunkt der ersten Untersuchung schon klinisch manifest. Daher ist eine symptomatische Behandlung bei solchen Patienten umgehend einzuleiten, in besonders schweren Fällen sogar bevor mit einer kausalen Therapie der primären Magen-Darm-Erkrankung begonnen werden kann. Medikamente, die hierfür zur Anwendung kommen, sind Infusionslösungen verschiedener Art, nicht-steroidale Antiphlogistika, sowie Gerinnungshemmer. Der Umfang und die Dauer dieser Therapie ist nach dem objektiven Zustand des Patienten zu richten.

Literatur

- Becker, K. P.* (1992): Persönliche Mitteilung
- Birk, S.* (1988): Endotoxine – ihre Bedeutung für die Entstehung boviner postpartaler Kolimastitiden unter besonderer Berücksichtigung der Endotoxin-Nachweisverfahren in Blut und Milch. Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover
- Burrows, G. E.* (1979): The effects of repeated administration of *Escherichia coli* lipopolysaccharides to ponies. *Can. J. Comp. Med.* 43, 321–327
- Burrows, G. E.* (1981): Endotoxaemia in the horse. *Equine vet. J.* 13, 89–94
- Cohen, N. D., E. M. Parson, T. L. Seahorn und G. K. Carter* (1994): Prevalence and factors associated with development of laminitis in horses with duodenitis/proximal jejunitis: 33 cases (1985–1991). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204, 250–254
- Dreist, M.* (1988): Verlaufsuntersuchungen des Endotoxinpiegels in Blut und Milch von Kühen mit gastrointestinalen Störungen unter besonderer Berücksichtigung der Pathogenese der Koli-Mastitis. Dissertation Tierärztliche Hochschule Hannover
- Gao, Q. Y., G. X. Fan und G. M. Zhang* (1988): Study on acute colitis in horses. *Chinese J. Vet. Sci. Tech.* 2, 5–9
- Holland, M., A. B. Kelly, J. R. Snyder, E. P. Steffey, N. Willits und D. McNeal* (1986): Antithrombin III activity in horses with large colon torsion. *Am. J. Vet. Res.* 47, 897–900
- Hurley, J. C.* (1992): Antibiotic-induced release of endotoxin: A reappraisal. *Clin. Infect. Dis.* 15, 840–854
- Huskamp, B.* (1982): Magen- und Darmkrankheiten in: *O. Dietz und E. Wiesner* (Hrsg.): Handbuch der Pferdekrankheiten für Wissenschaft und Praxis. Verlag Gustav Fischer, Jena, Bd 2, 513, 520
- Kamphues, J.* (1992): Lipopolysaccharid-Konzentrationen im Magen-Darm-Trakt von Ponys nach Aufnahme von Heu bzw. einer kraftfuttermittlerreichen Ration. in: 1. Europ. Konf. über d. Ernähr. d. Pferdes, Hannover 1992, Pferdeheilkunde Sonderdruck, 1992, 59–62
- King, J. N. und E. L. Gerring* (1988): Detection of endotoxin in cases of equine colic. *Vet. Rec.* 123, 269–271
- King, J. N. und E. L. Gerring* (1991): The action of low dose endotoxin on equine bowel motility. *Equine vet. J.* 23, 11–17
- Latimer, K. S.* (1991): Diseases affecting leukocytes. in: *P. T. Colahan, I. G. Mayhew, A. M. Merritt und J. N. Moore* (Hrsg.): *Equine medici-*

- ne and surgery. 4. Aufl. American Veterinary Publications, Inc. Goleta, California, Bd 2, 1809–1819
- Meister, D., M. Hermann und R. Straub (1992): Der Schock beim Pferd: Pathogenese, klinisches Bild, Diagnostik und Therapie. Pferdeheilkunde 8, 141–151
- Meyers, K., S. Reed, M. Keck, M. Clem und W. Bayly (1982): Circulating endotoxin-like substance(s) and altered hemostasis in horses with gastrointestinal disorders: An interim report. Am. J. Vet. Res. 43, 2233–2238
- Mitzner, S. (1993): Rundtisch-Gespräch: „Bedeutung von Endotoxin und Interleukin in der Diagnostik der Sepsis“. Haemochrom Diagnostica GmbH, Essen 24.11.1993.
- Moore, J. N. (1985): Management of pain and shock in equine colic. Comp. Cont. Ed. Pract. Vet. 7, 169–175
- Moore, J. N. (1988): Recognition and treatment of endotoxemia. Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 4, 105–113
- Moore, J. N. (1991): Rethinking endotoxaemia in 1991. Equine vet. J. 23, 3–4
- Moore, J. N., H. E. Garner, J. N. Berg und R. F. Sprouse (1979): Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report. Am. J. vet. Res. 40, 722–723
- Moore, J. N., H. E. Garner, J. E. Shapland und R. G. Schaub (1981): Equine endotoxemia: An insight into cause and treatment. J. Am. vet. med. Ass. 179, 473–477
- Morris, D. D. (1987): Medical management of equine colic. Veterinary Medicine 82, 158–176
- Morris, D. D. (1992): Hemostatic disorders in horses. Proceedings of the north american veterinary conference, Fachgeb. Pferde, Orlando, Florida, 1992., 477–479
- Morris, D. D. und J. Beech (1983): Disseminated intravascular coagulation in six horses. J. Am. Vet. Med. Assoc. 183, 1067–1072
- Muir, W. W. (1987): Equine shock: The need for prospective clinical studies. Equine vet. J. 19, 1–7
- Murray, M. J. (1990): Therapeutic procedures for horses with colitis. Vet. Medicine 85, 510–518
- Pohlentz, J. (1993): Pathologische Befunde und mögliche Pathogenese der Typhlokolitis. In: Symposium über Typhlokolitis beim Pferd, Essen 1993. Kongr. Ber., 2–4
- Rietschel, E. TH., L. Brade, F. U. Schade, U. Seydel, U. Zähringer, U. Mamat, G. Schmidt, A. J. Ulmer, H. Loppnow, H. D. Flad, F. Di Padova, M. H. Schreier und H. Brade (1993): Bakterielle Endotoxine: Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und biologischer Wirkung. Immun. Infekt. 21, 26–35
- Rooney, J. R., J. T. Bryans, M. E. Prickett und W. W. Zent (1966): Exhaustion shock in the horse. Cornell Vet. 56, 220–235
- Rose, R. J. und J. D. Wright (1991): Systemic diseases involving multiple body systems. in: P. T. Colahan, I. G. Mayhew, A. M. Merritt und J. N. Moore (Hrsg.): Equine medicine and surgery. 4. Aufl. American Veterinary Publications, Inc. Goleta, California, Bd 1, S. 159–164
- Sprouse, R. F., H. E. Garner und E. M. Green (1987): Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. Equine vet. J. 19, 25–28
- Stashak, T. S. (1989): Adams' lameness in horses. 4. Aufl. Lea & Febiger, Philadelphia, Pennsylvania, USA. S. 486
- Van Deventer, S. J. H. (1988): Endotoxins in the pathogenesis of gram-negative septicemia. Universität Amsterdam, Diss.
- Weiss, E. (1993): Ergänzende Anmerkungen zur Ätiologie und Pathogenese der Typhlokolitis anhand des eigenen Sektionsmaterials der letzten zwei Jahre. In: Symposium über Typhlokolitis beim Pferd, Essen 1993. Kongr. Ber., 5
- White II, N. A. (1990): The equine acute abdomen. Verlag Lea & Febiger, Philadelphia, London

Dr. med. vet. Aleksandar Vidovic

Tierärztliche Klinik Altforweiler
Raiffeisenstraße 100
66802 Überherrn

Tel.: 06836/9 20 50
Fax.: 06836/92 05 55

Prof. Dr. med. vet. Bernhard Huskamp

Tierklinik Hochmoor
Von-Braun-Straße 10
48712 Gescher-Hochmoor

Tel.: 02863-20990
Fax.: 02863-209920