

## V. Zusammenfassung

Aktivierete partielle Thromboplastinzeit (aPTT) und Thromboplastinzeit (TPZ) wurden bisher bei der Katze in der Regel mit kommerziellen Reagenzien und der für die Verhältnisse beim Menschen abgestimmten Methodik gemessen. Obgleich die Aktivität der Einzelfaktoren bei der Katze teilweise deutlich von derjenigen des Menschen abweicht, wurde der diagnostische Wert dieser Methoden als sensitive Screeningtests bei der Katze bisher nicht systematisch untersucht.

Ziel dieser Arbeit war es daher anhand von Verdünnungsreihen von Katzenpoolplasma und Katzenplasmen mit verminderter Einzelfaktoraktivität die herkömmliche Methodik für die Messung von aPTT und TPZ bei der Katze kritisch zu überprüfen und gegebenenfalls optimierte Methoden zu entwickeln.

Für die Erstellung von Referenzbereichen und für Poolplasma wurden Blutproben von insgesamt 65 gesunden, erwachsenen Katzen verschiedener Rassen und Geschlechter verwendet. Zur Untersuchung der Sensitivität verschiedener Testansätze von aPTT und TPZ standen ebenfalls insgesamt 65 Proben mit verminderter oder erhöhter Gerinnungsfaktoraktivität zur Verfügung.

Hierzu mußten zunächst optimierte Testansätze und Referenzbereiche für die Aktivitätsmessung einzelner Gerinnungsfaktoren und die Thrombinzeit (TZ) bei der Katze erarbeitet werden.

Bei der Messung der Gerinnungsfaktoren II, V, VII und X wurden orientierend die verschiedenen Verdünnungen von KPP mit Puffer (1:10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 und 1280) unter Verwendung zweier Ca-Thromboplastinreagenzien (Kaninchenhirnthromboplastin; standardisiertes Humanplazentathromboplastin) gemessen.

Die Voruntersuchung ergab, daß bei der notwendigen Probenverdünnung von 1 : 40 ein kommerzielles Humanplazentathromboplastin besser als Aktivatorreagenz geeignet ist als ein Kaninchenhirnthromboplastin. Für die optimierte Messung (50 µl 1 : 40 verdünnte Probe und 50 µl Mangelplasma 1 Minute bei 37 °C inkubieren, Zugabe von 200 µl Ca-Thromboplastin) wurden Referenzkurven für KPP erstellt und Referenzbereiche (n=57) errechnet (Faktor II: 74-126 %, V: 42-184 %; VII: 56-150 %, X: 65-143 %). Die Messung der verschiedenen Verdünnungen des Standardhumanplasmas ergab, daß die Katze im Vergleich zum Menschen eine teilweise deutlich abweichende Einzelfaktoraktivität (Faktor II: 94 %, V: 500 %, VII: 125 %, X: 62 %) besitzt.

Die Aktivität der Faktoren VIII:C, IX, XI und XII wurde ebenfalls mit einer Probenverdünnung von 1 : 40 und kommerziellem Humanmangelplasma und Aktivatorreagenz gemessen. Mit dem optimierten Test wurden bei der Katze Referenzbereiche (n=58) für die Aktivität der Gerinnungsfaktoren VIII:C (71 - 124 %), IX (81-130 %), XI (69-134 %) und XII (51- 142 %) erstellt. Im Vergleich zu einer mit KPP erstellten Referenzkurve wies der Mensch (kommerzielles Humanreferenzplasma) eine Faktor VIII:C-Aktivität von 7,6 % auf. Damit verfügt die Katze über eine etwa 13fach höhere Faktor VIII:C-Aktivität als der Mensch. Für die Faktor IX-, XI- und XII-Aktivität ergaben sich hier deutlich unterschiedliche Werte in Abhängigkeit von der Verdünnung des Humanplasmas. Annähernd war die Aktivität des Faktors IX 90%, des Faktors XI 170% und des Faktors XII 135% im Vergleich zur Katze.

Die Messung der TPZ erfolgte mit dem Standardtest (herkömmlicher Test) und den modifizierten Tests (Inkubation von 100 µl 1:5, 1:10 und 1:20 mit Puffer verdünntes Plasma und 100 µl Fibrinogenlösung (2 g/l Humanfibrinogen), Zugabe von 100 µl Ca-Thromboplastinreagenz). Die höchste Sensitivität der TPZ bei 31 Plasmen mit verminderter Einzelfaktoraktivität (Faktor II, V, VII und X) wurde mit der 1:10 bzw. 1:20 Probenverdünnung erzielt (0.81), während die Sensitivität des Standardtests bei 0.48 lag. Ebenfalls war die Sensitivität des 1:10 und 1:20 modifizierten Tests bei 24 Plasmen mit erhöhter Einzelfaktoraktivität im Vergleich zum Standardtest höher (Standardtest: 0.33, modifizierte Tests: 0.54). Referenzbereiche für die TPZ Methoden wurden mit Hilfe von 54 gesunden Katzen errechnet (Standardtest: 9.1 - 11.4 sec., 1:5 Probenverdünnung: 14.1 - 20.4 sec., 1:10 Probenverdünnung: 17.9 - 28.1 sec., 1:20 Probenverdünnung: 24.6 - 49.4 sec.).

Die aPTT wurde in dieser Arbeit mit dem Standardtest und einem durch 1:1, 1:1.5, 1:2 und 1:2.5 Probenverdünnung und Fibrinogenzusatz modifizierten Test unter Verwendung eines kommerziellen Aktivatorreagenzes gemessen. Die Sensitivität der aPTT Methoden wurde bei 21 Plasmen mit verminderter Einzelfaktoraktivität (Faktor II, V, VIII:C, IX, X, XI und XII) aber normaler TZ (Referenzbereich: 17.5 - 22.5 sec.) überprüft. Die herkömmlich gemessene aPTT spiegelte in allen 21 Plasmen durch Verlängerung über den Referenzbereich (14.6-24.4 sec., 42 gesunden Katzen) hinaus den Gerinnungsfaktormangel wider. Testansätze mit Probenverdünnung wiesen im Vergleich hierzu eine geringere Empfindlichkeit auf (3 - 4 falsch negative Resultate), deren Ursache im wesentlichen in der deutlichen Zunahme der Streuung der Referenzwerte lag. Die mit einem empfindlichen Reagenz nach der für die Anweisung beim Menschen optimierten Testanleitung gemessene aPTT ist damit auch bei der Katze ein wertvoller Suchtest, während die TPZ erst nach entsprechender Optimierung eine ausreichende Einzelfaktor empfindlichkeit aufweist.

## VI. Summary

Deniz, Abdülkerim

**Sensitivity respecting individual coagulation factor activity of the prothrombin time and activated partial thromboplastin time in cats.**

In cats the activated partial thromboplastin time (aPTT) and prothrombin time (PT) have so far generally been measured using commercial reagents and methods optimized for humans. Although the activity of different individual coagulation factors in the cat is in part clearly different from that in humans, the value of these methods as sensitive screening tests for the cat has so far not been studied.

Therefore, the aim of this study was to investigate the applicability of the conventional methods of measurement of aPTT and PT in cats using different dilution series of cat pool plasma (CPP) and plasma samples of cats with a reduced activity of individual factors as well as to develop optimized methods where required. First of all, optimized tests and reference ranges for the measurement of the individual coagulation factors and the thrombin time were prepared.

For the preparation of reference ranges and for pool plasmas samples of altogether 65 healthy, adult cats of different breeds and sex were used. For the investigation of the sensitivity of different tests of aPTT and PT also 65 plasma samples with reduced or increased single factor activity were available.

For the measurements of the coagulation factors II, V, VII and X different dilutions of CPP with buffer (1:10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 and 1280) were measured using two Ca-Thromboplastin reagents (rabbit brain thromboplastin; standardized human placental thromboplastin).

The preliminary studies proved that at the essential sample dilution of 1:40 the commercial human thromboplastin is more suitable as an activating reagent compared with the rabbit brain thromboplastin. For the optimized measurement (incubation of 50  $\mu$ l 1:40 diluted sample and 50  $\mu$ l of deficient plasma for 1 min at 37 °C, addition of 200  $\mu$ l of Ca-thromboplastin) reference curves were prepared with CPP and reference ranges (n=57) were calculated (Factor II: 74-126%, V: 42-184%, VII: 56-150%, X: 65-143%). The measurement of the different dilutions of the standard human plasma showed that the cat possesses very different individual factor activity (Factor II: 94%, V: 500%, VII: 125%, X: 62%).

The activity of the factors VIII:C, IX, XI and XII were similarly measured using a 1:40 dilution, commercial human deficient plasma and activating reagents. Reference ranges (n=58) were prepared with the optimized method for the coagulation factors VIII:C (71-124%), IX (81-130%), XI (69-134%) and XII (51-142%). Compared with the reference curve prepared with CPP, humans (commercial reference plasma) showed a factor VIII:C activity of 7.6%. Cats, therefore, have an about 13 fold higher factor VIII:C activity as compared to humans. Depending on the dilution, human plasma showed clearly different activity values with respect to the factors IX, XI, and XII. The activities of factors IX, XI and XII were approximately 90, 170 and 135%, respectively, compared to that of the cat.

The measurement of the PT was conducted using the standard test (conventional) test and the modified tests (incubation of 100  $\mu$ l plasma diluted 1:5, 1:10 and 1:20 buffer and 100  $\mu$ l of fibrinogen solution, addition of 100  $\mu$ l Ca-thromboplastin reagent). In 31 plasma samples with reduced individual factor activity (factor II, V, VII and X), the highest sensitivity of the PT (0.81) was achieved with the 1:10 or 1:20 dilution, while the sensitivity of the standard test was 0.48. Similarly in 24 samples with increased individual factor activity the sensitivity of the test modified by a 1:10 and 1:20 sample dilution was higher (0.54) in comparison to the standard test (0.33).

Reference ranges for the different PT methods were calculated using 54 healthy cats (standard test: 9.1-11.4 sec., 1:5 sample dilution : 14.1-20.4 sec., 1:10 sample dilution: 17.9-28.1 sec., 1:20 sample dilution: 24.6-49.4 sec.).

The aPTT was measured using a standard test as well as a modified test, with the sample dilutions of 1:1, 1:1.5, 1:2 and 1:2.5 , an addition of fibrinogen and employing a commercial activating reagent. The sensitivity of the aPTT methods were tested on 21 plasma samples with a reduced individual factor activity (factor II, V, VIII:C, IX, X, XI and XII) but normal thrombin time (reference range: 17.5 - 22.5 sec.). In all the 21 samples the conventionally measured aPTT reflected the deficiency of the coagulation factors by prolongation of the coagulation time over the reference ranges (14.6-24.4 sec., 42 healthy cats). The tests with different dilutions showed a reduced sensitivity (3-4 falsely positive results). This was mainly caused by the distinct increase of the range of the reference values.

In conclusion, the aPTT measured with a sensitive reagent according to the test protocol optimized for humans is also in cats a valuable screening test. The PT, however, shows sufficient sensitivity for individual factors only when using the optimized test.