

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann
und Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns

Untersuchung eines nadellosen Injektionsverfahrens für Schweine

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Regina Maria Uhl
aus München

München 2013

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Korreferent/in: Univ.-Prof. Dr. Ellen Kienzle

Tag der Promotion: 9. Februar 2013

Herrn Professor Heinritzi

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	9
2	LITERATURÜBERSICHT	11
2.1	Gesetzliche Grundlagen	11
2.2	Intramuskuläre Injektionen.....	11
2.2.1	Technik der nadellosen Injektion.....	12
2.2.2	Schmerzempfinden und Lokalreaktion	13
2.2.3	Penetration.....	15
2.2.4	Zuverlässigkeit	16
2.2.5	Serokonversion	18
2.2.6	Kreuzkontamination	19
2.2.7	Verbraucherschutz	20
2.3	Stress	20
2.3.1	Stressvariablen	22
2.3.2	Cortisol.....	23
2.4	Gewebeläsionen.....	25
2.4.1	Creatinkinase	26
2.4.2	Aspartataminotransferase	27
2.4.3	CK/AST Quotient.....	28
2.5	Lokalreaktion.....	28
2.5.1	Makroskopisch	29
2.5.2	Histologisch.....	29
3	MATERIAL UND METHODEN	31
3.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen	31
3.2	Versuchsvorhaben.....	32
3.2.1	Injektionspräparate.....	32

3.2.2	Viskositätsmessung.....	33
3.2.3	Applikation der Injektionspräparate	33
3.2.3.1	Injektion mit Nadel.....	34
3.2.3.2	Nadellose Injektion per Druckluft.....	34
3.3	Versuchsgruppen	35
3.3.1	Klinische Untersuchung.....	35
3.3.1.1	Einschluss	36
3.3.1.2	Versuchsablauf.....	37
3.3.1.3	Laborparameter.....	37
3.3.1.4	Lokalreaktion	38
3.3.2	Pathohistologische Untersuchung	39
3.3.2.1	Einschluss	39
3.3.2.2	Versuchsablauf.....	40
3.3.2.3	Sektion	40
3.3.2.4	Zuschnitte der Gewebeproben	41
3.3.2.5	Entwässern und Einbetten.....	43
3.3.2.6	Herstellung der histologischen Schnitte	43
3.3.2.7	Histologische Auswertung	43
3.4	Statistik	44
4	ERGEBNISSE.....	46
4.1	Viskositätsmessung.....	46
4.2	Klinische Untersuchung	47
4.2.1	Lokalreaktion	47
4.2.1.1	Saugferkel am 3. Lebenstag.....	49
4.2.1.2	Saugferkel am 14. Lebenstag.....	51
4.2.2	Cortisol	60
4.2.2.1	Saugferkel am 3. Lebenstag.....	60
4.2.2.2	Saugferkel am 14. Lebenstag.....	63
4.2.3	CK und AST	65
4.2.3.1	CK bei Saugferkeln am 3. Lebenstag.....	67

4.2.3.2 CK bei Saugferkeln am 14. Lebenstag.....	67
4.2.3.3 CK/AST-Quotient	69
4.2.4 Eisen	71
4.2.4.1 Saugferkel am 3. Lebenstag	72
4.2.4.2 Saugferkel am 14. Lebenstag	74
4.3 Pathoanatomische und histologische Untersuchung	75
4.3.1 Makroskopische Untersuchung	75
4.3.1.1 Lokalreaktion.....	75
4.3.1.2 Transversalschnitt.....	77
4.3.1.3 Untersuchungsebenen	78
4.3.2 Histologische Untersuchung.....	80
4.3.2.1 Injektion von isotonischer Kochsalzlösung.....	83
4.3.2.1.1 24 Stunden nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung.....	84
4.3.2.1.2 7 Tage nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung	86
4.3.2.2 Injektion von Vitamin-E-Selen	88
4.3.2.2.1 24 Stunden nach der Injektion von Vitamin-E-Selen	89
4.3.2.2.2 7 Tage nach der Injektion von Vitamin-E-Selen	91
4.3.2.3 Injektion von Eisendextran	93
4.3.2.3.1 24 Stunden nach der Injektion von Eisendextran	94
4.3.2.3.2 7 Tage nach der Injektion von Eisendextran	96
4.3.2.3.3 Verteilung des Eisendextrans.....	98
4.4 Benutzerfreundlichkeit	99
4.4.1 Handhabung.....	99
4.4.2 Lärmpegel	100
5 DISKUSSION.....	101
5.1 Verträglichkeit der nadellosen Injektion	101
5.1.1 Stress- und Schmerzreaktion	102
5.1.2 Untersuchung der Lokalreaktion	105
5.1.2.1 Tiefe der Entzündungsreaktion	105
5.1.2.2 Entzündung und Muskelzelluntergang	107

5.1.2.3	Entzündung aufgrund Fremdkontamination.....	108
5.1.3	Gewebeläsionen.....	109
5.2	Zuverlässigkeit der nadellosen Injektion	110
5.2.1	Verteilungsmuster.....	110
5.2.2	Pharmakokinetik.....	112
5.2.2.1	Eisenkonzentration im Blut.....	112
5.2.2.2	Intramuskuläre Anreicherung des Eisendextrans	114
5.2.2.3	Verluste an Injektionsvolumen.....	115
6	SCHLUSSFOLGERUNG	117
7	ZUSAMMENFASSUNG	120
8	SUMMARY	122
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	124
10	TABELLENVERZEICHNIS	128
11	LITERATURVERZEICHNIS	131
	DANKSAGUNG	142

Abkürzungsverzeichnis

µm	Mikrometer
µmol/l	Mikromol pro Liter
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AST	Aspartataminotransferase
AMG	Arzneimittelgesetz
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
ca.	circa
CK	Kreatinkinase
cm	Zentimeter
d	Tag/e
db	Dezibel
h	Stunde/n
HE	Hämatoxylin/Eosin
HPA	hypothalamic-pituitary-adrenal
i.m.	intramuskulär
K	Kunststoff
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
l	Liter
ml	Milliliter
MPG	Medizinproduktegesetz
NII.	Nodi lymphatici
LT	Lebenstag
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
NaCl	Natrium-Chlorid
ng/dl	Nanogramm pro Deziliter
P	Paraffin
ProdSG	Produktsicherheitsgesetz
U/l	Units pro Liter

USA	United States of America
Vit-E-Se	Vitamin-E-Selen
VO	Verordnung

1 Einleitung

Sowohl in der Humanmedizin als auch in der Tiermedizin ist eine Vielzahl von Arzneimitteln für die intramuskuläre Injektion zugelassen. Als gängigste Methode der Injektion hat sich hierfür die Kanüle etabliert. Denn sie erfüllt die Forderung nach einer sicheren und schonenden Applikation von Injektionslösungen. Man ist jedoch bestrebt, die Sicherheit und Verträglichkeit von Injektionsverfahren zu optimieren, daher werden Injektionskanülen beständig technisch weiterentwickelt. Aber es werden auch Alternativen zur Injektion mit Kanülen erforscht, die diese Anforderungen noch besser erfüllen können.

Eine Alternative zur intramuskulären Medikamentenapplikation stellt die nadellose Injektion per Druckluft dar, bei der man gänzlich auf Kanülen verzichtet. Die ersten Berichte über die Anwendung von nadellosen Injektionsgeräten in der Medizin entstanden vor über 80 Jahren. Die erste Patentierung eines nadellosen Injektionsgerätes wurde in den 30er Jahren in den U.S.A. registriert (BAXTER und MITRAGOTRI, 2006). Eine der ersten Studien, die diese Technologie zur Injektion von Arzneimitteln wissenschaftlich untersucht, stammt von HINGSON und HUGHES (1947). Seit den Anfängen der nadellosen Injektion in der Medizin wurde eine Vielzahl von Geräten für den Einsatz in der Humanmedizin entwickelt. Injektionsgeräte wie *Biojector*[®], *INJEX*[®] oder *Dermojet*[®] stellen nur eine Auswahl der nadellosen Injektionsgeräte dar, die aktuell häufiger in der Literatur Erwähnung finden. Dort wird über den erfolgreichen Einsatz von nadellosen Injektionsgeräten zur Impfung, bei der Diabetestherapie und zur Anästhesie, insbesondere bei der Dentalchirurgie, berichtet. Dabei wurden schwerpunktmäßig deren Verträglichkeit und Akzeptanz unter den Patienten sowie die Medikamentenwirksamkeit nach der Injektion untersucht. Die technische Entwicklung dieser Injektionsgeräte wird beständig überarbeitet und konkurriert in verschiedenen medizinischen Bereichen mit der konventionellen Injektionskanüle um optimale Verträglichkeit und Sicherheit. Auch bei Schweinen wurden nadellose Injektionsgeräte bereits in den späten 80er und frühen 90er Jahren zur Impfung eingesetzt (VANNIER und CARIOLET, 1991). Zu dieser Zeit wurden stets humanmedizinische Geräte zur nadellosen Injektion in der Tiermedizin eingesetzt. Erst in den letzten Jahren wird verstärkt an der Entwicklung von nadellosen Injektionsgeräten für Tiere geforscht.

Anfang des Jahres 2011 wurde die nadellose Injektion für Schweine in verschiedenen landwirtschaftlichen Magazinen in Deutschland als Neuigkeit vorgestellt. Berichte verglichen drei nadellose Injektionssysteme, die in diesem Zeitraum landesweit in den Verkehr gebracht wurden.

- *IDAL[®]* (*MSD Tiergesundheit*, Unterschleißheim)
- *AcuShot[™]* (Vertrieb durch *GFS*, Ascheberg)
- *Pulse[®]* (Vertrieb durch *Schippers GmbH*, Kerken)

Diese nadellosen Injektionsgeräte sind speziell für die Anwendung beim Schwein entwickelt worden und sind derzeit europaweit frei im Handel erhältlich.

Das *IDAL[®]*-Injektionsgerät besitzt eine Zulassung für den Impfstoff *Porcilis[®] PRRS* (*MSD Tiergesundheit*). Mit den beiden letzteren Geräten ist eine Applikation von Arzneimitteln aller Art möglich, allerdings gibt es keine spezielle deutsche oder europäische Zulassung für bestimmte Arzneimittel. Die Zahl der Veröffentlichungen zur Anwendung dieser veterinärmedizinischen Injektionsgeräte blieb seit ihrer Entwicklung überschaubar. Die Schwerpunkte der Forschung lagen dabei eindeutig auf dem Aspekt der Wirksamkeit von nadellos verabreichten Impfstoffen. Nur wenige Studien untersuchten die Arzneimittelverfügbarkeit von anderen Medikamenten als Impfstoffen. Vereinzelt wurde in Studien auf die injektionsbedingten Lokalreaktionen eingegangen. Doch zur Verträglichkeit von nadellosen Injektionsgeräten gibt es aus der Veterinärmedizin noch keine Erkenntnisse (CHASE et al., 2008).

Ziel der Untersuchung war es, diese drei letztgenannten Aspekte bei der Anwendung des *Pulse[®] 250* (*Pulse Needlefree Systems*, Kansas, USA, Vertrieb durch *Schippers*, Kerken) an Schweinen zu untersuchen.

2 Literaturübersicht

2.1 Gesetzliche Grundlagen

Instrumente, die unter anderem zum Zwecke der Verhütung, Behandlung oder Linderung von Krankheiten eingesetzt werden, fallen unter das Medizinproduktegesetz (§3 Abs. 1 MPG). Solche Instrumente unterliegen der Zulassungspflicht und dürfen in Deutschland nur in den Verkehr gebracht oder in Betrieb genommen werden, wenn sie gemäß §6 Abs. 1 MPG mit einer CE-Kennzeichnung versehen sind. Dies gilt jedoch nur für Medizinprodukte, die zur Anwendung am Menschen bestimmt sind. Für Medizinprodukte, die zur Anwendung am Tier bestimmt sind, gelten diese gesetzlichen Vorgaben nicht.

Nach Auffassung des BVL ist ein nadelloses Injektionsgerät wie ein tierärztliches Instrument zu behandeln, das zur mehrmaligen Anwendung am Tier bestimmt ist. Damit gilt es weder als Medizinprodukt noch als Arzneimittel und unterliegt folglich auch nicht der Zulassungspflicht nach dem AMG § 2 Abs. 2 unter dem Vorbehalt, dass eine Einstufung über die Zulassungspflicht eines Arzneimittels in die Zuständigkeit der Landesbehörden fällt (§ 21 Abs. 4 AMG). Für die in der Einleitung vorgestellten Injektionsgeräte ist dies nicht der Fall. Diese Geräte fallen also nicht in den Zuständigkeitsbereich des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz.

Statt in den medizinischen Bereich fällt diese Kategorie von nadellosen Injektionsgeräten zur mehrmaligen Verwendung am Tier unter das Produktsicherheitsgesetz, welches unter anderem arbeitsschutzrechtliche Bestimmungen regelt. Demnach darf ein Produkt auf dem Markt nur bereitgestellt werden, wenn es die Sicherheit und Gesundheit von Personen oder Rechtsgüter bei bestimmungsgemäßer oder vorhersehbarer Verwendung nicht gefährdet (§ 3 Abs. 1 ProdSG).

2.2 Intramuskuläre Injektionen

Landwirtschaftliche Nutztiere erhalten im Laufe ihres Lebens eine Vielzahl von routinemäßigen Injektionen. Zahlreiche Arzneimittel für Schweine sind gemäß ihrer Zulassung an eine intramuskuläre Verabreichung gebunden. Es sind gegenwärtig mehrere Methoden verfügbar, um eine Injektionslösung intramuskulär zu

verabreichen. Die am meisten verbreitete und gebräuchliche Methode ist der Einsatz von Injektionskanülen, die hinsichtlich ihrer Beschaffenheit (u. a. DIN EN ISO 7864, DIN 13097-4, DIN EN ISO 6009) allgemeingültigen Normen unterliegen. Alternativen zur traditionellen Injektion sind der Einsatz von Microneedles oder der nadellosen Injektion mittels Hochdruck (MITRAGOTRI, 2005).

2.2.1 Technik der nadellosen Injektion

Das Prinzip der nadellosen Injektion basiert auf der Erzeugung eines Hochgeschwindigkeits-Flüssigkeitsstrahles, der durch seine kinetische Energie in der Lage ist, weiche Gewebe zu penetrieren. Der Flüssigkeitsstrahl kann bei diesem Vorgang die Haut, Unterhaut und den Muskel durchdringen (MITRAGOTRI, 2006). Der Hochgeschwindigkeits-Strahl wird erzeugt, indem ein bestimmtes Flüssigkeitsvolumen mittels Druck schlagartig durch eine Düse mit geringem Durchmesser gepresst wird. Die Druckquelle kann dabei mechanisch mit einer Sprungfeder oder mittels Druckluft arbeiten (SCHRAMM und MITRAGOTRI, 2002).

Der Durchmesser der Düse liegt im Mikrometer-Bereich, der bei den kommerziell erhältlichen Geräten in der Regel zwischen 100 µm und 500 µm variiert (SHERGOLD et al., 2006).

Die Eindringtiefe des Flüssigkeitsstrahles in das Gewebe richtet sich nach seiner kinetischen Energie (INOUE et al., 2010). Nach SCHRAMM und MITRAGOTRI (2002) bestimmen der Durchmesser, die Geschwindigkeit und indirekt der Druck des Flüssigkeitsstrahles die Eindringtiefe. Es gibt Injektoren mit konstanten Druckeinstellungen und solche mit manuell regulierbarem Druck, bei denen die Injektionstiefe angepasst werden kann. So ist es beim *Pulse*[®] 250 laut den Angaben des Herstellers möglich, durch Anpassung der Druckeinstellung zwischen subkutaner oder intramuskulärer Injektion zu wählen.

Bei den nadellosen Injektoren unterscheidet man zwischen „*multi-use-nozzle*“ Injektoren und „*disposable-cartridge*“ Injektoren. Bei ersteren besteht die Vorrichtung, durch die der Flüssigkeitsstrahl aus dem Injektor ausströmt, aus einem fest arretierten, wieder verwendbaren Düsenkopf. Bei neueren Geräten aus der humanmedizinischen Forschung kommt die Injektionsdüse nicht direkt in Kontakt mit dem Patienten. Ihr ist ein auswechselbarer Düsenaufsatz vorgeschaltet, der zur einmaligen Verwendung vorgesehen ist und nach jeder Injektion ausgetauscht wird.

(MITRAGOTRI, 2005). Die in der Einleitung vorgestellten Injektoren, die für den veterinärmedizinischen Gebrauch bestimmt sind, gehören noch zum Typ der „*multi-use-nozzle*“ Injektoren.

2.2.2 Schmerzempfinden und Lokalreaktion

Schmerz entsteht bei einer Injektion durch die Aktivierung von freien Nervenendigungen, den sogenannten Nozizeptoren, die vor allem in der Haut aber auch in der Muskulatur anzutreffen sind. Afferente Fasern leiten diese Reize in die Strukturen des ZNS weiter, die an der Schmerzverarbeitung beteiligt sind. Die Muskulatur reagiert nicht sehr sensitiv auf Schmerzreize, während die Haut, die bei der Injektion penetriert wird, über 90% aller im Körper vorkommenden mechanischen, thermischen und chemischen Rezeptoren verfügt, die eine sehr intensive Schmerzempfindung bewirken (ERHARDT und HENKE, 2011). Gemäß MOLONY und KENT (1997) werden diese Schmerzen an der Körperoberfläche, wie sie bei einem Injektionsvorgang entstehen, als akute, somatische Schmerzen oder Oberflächenschmerzen klassifiziert.

Die herkömmliche Injektion mit Nadel wird seit fast 2 Jahrhunderten erfolgreich eingesetzt, kann aber Schmerzen verursachen und hat speziell in der Humanmedizin eine geringe Akzeptanz unter den Patienten mit Nadel-Phobie (GIUDICE und CAMPBELL, 2006). Die Schmerzintensität bei einer Injektion korreliert positiv und signifikant mit dem Durchmesser der Injektionskanüle und wird stärker empfunden, wenn die Injektion eine Blutung verursacht (ARENDT-NIELSEN et al., 2006). In der frühen Phase der Forschung im Gebiet der nadellosen Injektion hegte man die Hoffnung, eine alternative, schmerzlose Injektionsmethode zu erschaffen (FIGGE und BARNETT, 1948; FIGGE und GELHAUS, 1956).

Aber auch für nadellose Injektionsverfahren existieren mehrere Berichte über die Schmerzhaftigkeit und das Auftreten von ausgeprägten Lokalreaktionen nach einer Injektion, darunter Schwellungen, Verhärtungen, Erytheme oder Hämatome (SCHNEIDER et al., 1994; JACKSON et al., 2001; EPSTEIN et al., 2002; MITRAGOTRI, 2006; ARAPOSTATHIS et al., 2010). Auch wenn äußerlich keine Lokalreaktion erkennbar ist, können bisweilen sowohl der Zeitraum nach der Injektion als auch der Injektionsvorgang selbst als schmerzhaft empfunden werden (BENNETT et al., 1998). Andererseits wird die nadellose Injektion bisweilen von

Patienten nach subjektiven Kriterien bevorzugt, selbst wenn die Lokalreaktion klinisch stärker ausgeprägt ist (EPSTEIN et al., 2002).

Der entstehende Schmerz bei der nadellosen Injektion lässt sich nach STACHOWIAK et al. (2009) darauf zurückführen, dass bei den hohen Injektionsgeschwindigkeiten der Strahl die Haut nicht vollständig penetrieren kann und ein Teil der Injektionsflüssigkeit von der Oberfläche abprallt. Dies kann Hämatome, Prellungen und Schmerzen verursachen. Zudem stellt laut ARORA et al. (2007) die Injektionstiefe einen wesentlichen Faktor bei der Entstehung von Schmerzen dar, denn bei tieferen Injektionen wird die Zellintegrität stärker durch die einwirkenden Kompressions- und Scherkräfte geschädigt, als bei oberflächlichen Injektionen. Zusätzlich wird das Schmerzempfinden auch von gewebereizenden Eigenschaften des injizierten Arzneimittels beeinflusst (CHAVEZ MORENO und BICKHARDT, 1997; BENNETT et al., 1998).

Jedoch wird in eine Vielzahl an humanmedizinischen Studien die nadellose Injektion als angenehme und schmerzlose Alternative zu herkömmlichen Applikationsmethoden angesehen (BENNETT et al., 1998; COOPER et al., 2000; SARNO et al., 2000; JIMENEZ et al., 2006). Die langfristigen Injektionsschmerzen, die einen Tag nach der Injektion mit Kanüle noch andauern, werden von Testpersonen als unangenehmer empfunden als nach einer nadellosen Injektion (BENNETT et al., 1998). In diesen Studien wurden allerdings mit maximal 1 ml pro Injektion wesentlich geringere Injektionsvolumina verwendet, als dies mit veterinärmedizinischen Geräten wie dem *Pulse*[®] und dem *AcuShot*[™] möglich ist (BENNETT et al., 1998).

Eine Untersuchung der Lokalreaktion nach einer nadellosen Injektion mit dem *Pulse*[®] wurde an 102 Absetzferkeln im Verlauf einer *Mycoplasma hyopneumoniae*-Vakzination durchgeführt. Die makroskopische und histopathologische Untersuchung sowohl der Injektionsstelle als auch der tributären Lymphknoten ergaben keine Unterschiede hinsichtlich der Gewebeläsionen (HOUSER et al., 2004).

Im Gegensatz dazu fand man in einem Versuch an Rindern, die eine Impfung entweder per Nadel oder Druckluftinjektion mit dem *Pulse*[®] 250 erhielten, Unterschiede in der Ausprägung der Lokalreaktion. Sowohl die subjektive klinische Untersuchung der Injektionsstelle als auch die histologische Untersuchung des Gewebes an der Injektionsstelle ergab eine stärkere Entzündungsreaktion bei den mit Kanüle behandelten Tieren (IMSILP et al., 2005).

2.2.3 Penetration

Bevor das Injektat in die Tiefe der Muskelschichten gelangt, muss die Haut durch den Flüssigkeitsstrahl penetriert werden. Nach Untersuchungen von SHERGOLD et al. (2006) hinterlässt der Hochgeschwindigkeitsstrahl, der durch das nadellose Injektionsgerät erzeugt wird, bei der Perforation des Gewebes einen ebenmäßigen Riss, der etwas größer ist als der Durchmesser des Strahles. Durch den Widerstand des Gewebes verlangsamt sich der Strahl, bis die kinetische Energie nicht mehr ausreicht, um weiter ins Gewebe einzudringen, woraufhin die Hauptmasse des Injektates sich seitwärts im Gewebe verteilt.

Das Injektionsvolumen, das sich tatsächlich im Gewebe verteilt, kann sehr variabel sein, da die Eigenschaften der Haut individuell verschieden sind. Sowohl die Dicke der Haut als auch das Vorhandensein von Muskelfaszien an der Injektionsstelle beeinflussen die Penetrationstiefe von nadellos injizierten Präparaten (SCHRAMM und MITRAGOTRI, 2002; WAGNER et al., 2004). In einer Studie von JONES et al. (2005) wurde für eine nadellose Injektion eines identischen Volumens bei 4 Wochen alten Ferkeln ein geringerer Druck benötigt als bei 14 Wochen alten Ferkeln. Nach SCHRAMM und MITRAGOTRI (2002) ergeben sich auch Unterschiede zwischen menschlicher und porziner Haut. Die Injektionsqualität variiert sogar, wenn man nur die Haut verschiedener Körperstellen desselben Schweins vergleicht (WAGNER et al., 2004).

Die extreme Abhängigkeit von der Beschaffenheit der Hautoberfläche, gerade bei geringen Druckeinstellungen und Injektionsvolumina von 0,05 – 0,3 ml, zeigen WAGNER et al. (2004) in ihrer Studie, in der eine Vorbereitung der Schweinehaut durch Behandlung mit einer Peeling-Creme steigernde Auswirkungen auf die Penetrationstiefe hatten. Je näher sich hingegen eine Faszien-schicht der Muskulatur unter der Hautoberfläche befindet, desto stärker wird die Eindringtiefe reduziert.

Da die Eigenschaften der Haut zusätzlich von Umgebungsbedingungen wie der Luftfeuchtigkeit und Temperatur beeinflusst werden können, muss nach STACHOWIAK et al. (2009) davon ausgegangen werden, dass ein gewisses Maß an Unzuverlässigkeit bezüglich der Dosis, die tatsächlich ins Gewebe gelangt bei der nadellosen Injektion in Kauf genommen werden muss.

Auch die Körperbehaarung spielt nach JONES et al. (2005) eine nicht zu unterschätzende Rolle. Eine Studie verwendete das in der Humanmedizin

eingesetzte nadellose Injektionsgerät *Dermojet*[®] an Präparaten der nicht-rasierten Nackenhaut von 14 Wochen alten Schweinen. Injiziert wurden 0,08 g einer gefärbten wässrigen Dextran-Lösung, von der nur 0,03 g die Haut penetrierten. Der Rest prallte von der Haut ab und verblieb auf der Oberfläche. Für eine sichere Applikation eines Injektionsvolumens von 0,1 ml war unter den gegebenen Bedingungen eine dreimalige Wiederholung der Injektion nötig. Ferner konnte bei derselben Studie festgestellt werden, dass die Injektionstiefe bei nicht-rasierten Hautstellen geringer war als bei rasierten ($4,8 \pm 0,7$ mm und $6,6 \pm 1,1$ mm) (JONES et al., 2005). Dagegen betrug in einer Untersuchung von SCHLOESSER et al. (2008) beim Einsatz des *Pulse*[®] zur Injektion von Arzneimittelvolumina zwischen 0,1 und 0,5 ml der mittlere Anteil, der nicht durch die Haut drang, lediglich 0,005 ml. Dieser Anteil beinhaltet eine Spanne von 0,0012 – 0,0075 ml, da 4 verschiedene Injektionspräparate verwendet wurden. Die Unterschiede in der Penetrationsfähigkeit wurden dabei auf die physikalischen Eigenschaften der Präparate, insbesondere auf ihre Viskosität zurückgeführt.

Das Injektat folgt nach der Penetration der Haut dem Wege des geringsten Widerstandes im Gewebe, strömt also entlang von Leitstrukturen wie Faszien, dem Faserverlauf des intermuskulären Bindegewebes, Nervenfasern und größeren Blutgefäßen (BENNETT et al., 1971; ELGENEIDY et al., 1974; WAGNER et al., 2004; PRAESTMARK JUUL et al., 2012).

2.2.4 Zuverlässigkeit

Die Zuverlässigkeit einer nadellosen Injektion hängt von zahlreichen Faktoren ab. Die Eigenschaften des Gerätes, die die Injektionsgeschwindigkeit beeinflussen, haben nach STACHOWIAK et al. (2009) die größte Auswirkung auf die Menge der Injektionslösung, die tatsächlich in das Gewebe gelangt. Sowohl eine zu hohe als auch eine zu geringe Injektionsgeschwindigkeit bewirken das Zurückprallen eines Teils der Injektionslösung von der Hautoberfläche (STACHOWIAK et al., 2009). Bei einer zu hohen Injektionsgeschwindigkeit prallt ein Teil der Lösung von der Haut ab, noch bevor die Haut vollständig penetriert wurde und die Lösung ins Gewebe gelangen kann. Mit einer mittleren bis geringen Injektionsgeschwindigkeit, die den Anteil des Injektionspräparates, der von der Haut abprallt, minimiert, wird dagegen

nicht die erforderliche Injektionstiefe zur Verteilung des Präparates im gewünschten Gewebeabschnitt erreicht. Hierbei wird die Aufnahmekapazität des Gewebes überschritten und ein Teil der applizierten Flüssigkeit prallt wiederum von der Oberfläche ab (STACHOWIAK et al., 2009). Die Injektionstiefe ist zusätzlich von dem Volumen der applizierten Injektionslösung abhängig (WAGNER et al., 2004). Je höher das Injektionsvolumen ist, desto größer wird die Eindringtiefe (WAGNER et al., 2004). Zu große Injektionsvolumina führen dazu, dass die Aufnahmekapazität des Gewebes überschritten wird und ein Teil der applizierten Flüssigkeit von der Oberfläche abprallt. Auch die physikalischen Eigenschaften des Injektionspräparates, wie dessen Viskosität, spielen dabei eine Rolle (WAGNER et al., 2004; SCHLOESSER et al., 2008).

Auf die Bioverfügbarkeit des injizierten Arzneimittels hat die Wahl der Injektionsmethode jedoch laut APLEY et al. (2007) keinen Einfluss. In ihrer Studie mit 8 Absetzferkeln konnte unter Verwendung des *Pulse[®] 250* gezeigt werden, dass sich die Pharmakokinetik eines intramuskulär injizierten Ampicillin-Präparates nicht unterschied, unabhängig davon, ob es mit Nadel oder nadellos appliziert wurde. Verglichen wurden die maximale Serumkonzentration des Wirkstoffes, seine Halbwertszeit und mittlere Verweildauer. Alle Parameter waren bei der Injektion mit Kanüle höher als bei der nadellosen Injektion, allerdings nicht signifikant. Das ergab eine höhere Bioverfügbarkeit des Wirkstoffes bei den Schweinen, die eine Injektion per Nadel erhalten hatten. Jedoch variierte die Bioverfügbarkeit bei den Tieren untereinander zum Teil stärker als zwischen den Gruppen. Aus diesem Grund und wegen der geringen Versuchstierzahl waren die Unterschiede nicht signifikant (APLEY et al., 2007).

In einer humanmedizinischen Studie wird bestätigt, dass sich die Bioverfügbarkeit von nadellos applizierten Arzneimitteln nicht von derjenigen per Nadel applizierter Arzneimittel unterscheidet, (GREENBERG et al., 1995). Die Bioverfügbarkeit von nadellos applizierten Arzneimitteln soll derjenigen bei herkömmlicher Injektion mit Nadel gleichen oder ihr sogar überlegen sein (SCHRAMM und MITRAGOTRI, 2002). Laut WAGNER et al. (2004) hingegen war die resorbierte Konzentration von nadellos verabreichtem Insulin zu allen Messzeitpunkten signifikant niedriger als nach der Injektion mit Nadel. Dieser Unterschied wird auf eine geringere Injektionstiefe bei der nadellosen Injektion zurückgeführt. Von HOUTZAGERS et al. (1988) wird die

zwischen nadelloser Injektion und Injektion mit Nadel stark voneinander abweichende Resorptionskinetik, gemessen am Verlauf der Serumkonzentration eines Insulinpräparates, darauf zurückgeführt, dass beim Durchbrechen der Haut die kristalline Struktur des Präparates beeinträchtigt wird.

Jedoch wird beschrieben, dass die Resorption des Arzneimittels bei nadelloser Injektion schneller verläuft und die maximalen Blutkonzentrationen früher erreicht werden (SCHNEIDER et al., 1994; BENNETT et al., 1998). Trotz unterschiedlicher Zeit bis zum Erreichen maximaler Wirkspiegel, fällt die Konzentration des injizierten Arzneimittels bei beiden Injektionstechniken mit gleicher Geschwindigkeit wieder ab (BENNETT et al., 1998).

Da all diese Effekte von zahlreichen Faktoren abhängen, die kaum vorhersehbar und kalkulierbar sind, galt die nadellose Injektion lange Zeit als unzuverlässiger im Vergleich zur konventionellen Injektion mit Kanülen (THEINTZ und SIZONENKO, 1991).

2.2.5 Serokonversion

Die Applikation von Impfstoffen mittels nadelloser Injektion ist gesondert zu betrachten. Eine der wenigen verfügbaren wissenschaftlichen Abhandlungen über den Einsatz des nadellosen *Pulse*[®] Injektionsgerätes stammt von *Felton International*, dem US-amerikanischen Vertreiber und beschreibt beim Vergleich der Injektionstechniken eine identische Serokonversionsrate nach einer PRRS-Impfung von Sauen (COOK et al., 2003). Das gleiche Gerät wurde bei Absetzferkeln bei der Verwendung einer kommerziellen Vakzine gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* eingesetzt. Auch hier konnten nach zweimaliger Impfung keine Unterschiede in der Serokonversion zu der mit Nadeln vakzinierten Versuchsgruppe nachgewiesen werden (HOUSER et al., 2004). Auch MOUSEL et al. (2008) gelangen in ihrer Studie an Schafen mit dem *Pulse*[®] 250 zu dem Ergebnis, dass die nach einer Vakzination gebildete Antikörpermenge unabhängig von der Injektionsmethode gleich hoch ist. Weitere Studien, in denen andere nadellose Injektionssysteme zur intradermalen Applikation von Impfstoffen verwendet wurden, vergleichen den Impferfolg nach Impfung mit einer Vakzine gegen *Mycoplasma hyopneumoniae*. Die verwendeten nadellosen Injektionsgeräte injizierten die Vakzine vornehmlich in die oberflächlichen Schichten der Dermis und Subcutis. Es kommt in beiden Studien bei der nadellos geimpften

Gruppe zu einem höheren Anstieg des Antikörpertiters als bei der intramuskulär mit Kanüle geimpften Kontrollgruppe. Darüber hinaus treten in der nadellos geimpften Gruppe eine geringere Morbidität sowie weniger Lungenläsionen und Pleuritiden auf. Eine Vergleichsgruppe, die zwar intradermal geimpft wurde statt intramuskulär aber unter Verwendung einer Nadel, wies ebenfalls einen Antikörpertiter-Anstieg auf, der demjenigen der nadellos geimpften Gruppe entsprach (JONES et al., 2005; TASSIS et al., 2012).

2.2.6 Kreuzkontamination

Bei der Verwendung von Injektionskanülen besteht immer das Risiko einer hämatogenen Übertragung von pathogenen Erregern, wenn man dieselbe Kanüle für mehrere Tiere gebraucht. (OTAKE et al., 2002; REINBOLD et al., 2010). Dieses Risiko soll durch den Einsatz von nadellosen Injektionsverfahren vermieden werden (LEHNERT, 2011).

Beim Auftreffen des Strahls mit hoher Injektionsgeschwindigkeit und des daraus resultierenden Zurückpralls der Flüssigkeit auf der Haut kann es dennoch zu Kreuzkontaminationen kommen (HOFFMAN et al., 2001). Dies gilt nur für die oben beschriebenen „*multi-use-nozzle*“ Injektoren, die in der Humanmedizin wegen dieses Risikos als veraltet angesehen werden. Das Risiko von Kreuzkontaminationen wurde erstmals in der Öffentlichkeit thematisiert, als im Jahre 1985 gehäuft Fälle von Hepatitis-B-Infektionen in einer Humanklinik auftraten, die mit der Verwendung eines solchen Injektionsgerätes in Zusammenhang gebracht werden konnten (CANTER et al., 1990). Gemäß den Empfehlungen der WHO werden in der Humanmedizin bis auf Weiteres keine „*multi-use-nozzle*“ Injektoren mehr verwendet (REID, 2010).

Das Risiko einer Infektion mit hämatogen übertragbaren Krankheitserregern via nadelloser Injektion wird dennoch als wesentlich geringer angesehen als beim Einsatz kontaminierter Kanülen (GIUDICE und CAMPBELL, 2006). Dies zeigt auch eine Studie von REINBOLD et al. (2010) mit 20 Rindern, die eine iatrogene Übertragung von *Anaplasma marginale* bei Injektionen per Kanülen und nadellosen Injektions-vorrichtungen im Vergleich thematisiert. 10 Rinder erhielten eine Injektion mit Nadel und die anderen 10 Rinder eine nadellose Injektion mit dem *Pulse*® 250, nachdem ein Mastochse mit demselben Injektionsgerät bereits eine Injektion erhalten hatte. Der Mastochse war infiziert mit dem hämatogen übertragbaren

Erreger, wobei 6 der 10 Rinder nach der Injektion mit Nadel ebenfalls mit diesem Erreger infiziert waren. Bei den Rindern, die eine nadellose Injektion erhielten, fand dagegen bei keinem der 10 Tiere eine Erregerübertragung statt.

Auch kommen RAY et al. (2010) bei ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass bei der nadellosen Injektion mit dem *Pulse*[®] 250 vermehrt Oberflächenkeime, die sich auf der Haut befinden, in die Tiefe der Muskelschichten transferiert wurden, was bei Injektionen mit Nadeln in sehr viel geringerem Ausmaß der Fall war.

2.2.7 Verbraucherschutz

Mit der nadellosen Applikation von Medikamenten soll vermieden werden, dass abgebrochene Injektionskanülen als Residuum eines Anwenderfehlers im Tierkörper zurückbleiben und dadurch mit dem Lebensmittel in Verkehr gebracht werden (APLEY et al., 2007). Es gibt allerdings nur wenige Angaben über das tatsächliche Auftreten von Schäden am Schlachtkörper durch abgebrochene Injektionskanülen. Eine Angabe des *US-amerikanischen National Pork Producers Councils* beziffert von den insgesamt am Schlachthof verworfenen Schlachtkörperteilen denjenigen Anteil, der aufgrund von allgemein fehlerhaften Injektionen verworfen werden mit 3,9% in der Schlachthalle, und mit 13,5% im Zerlege-Bereich (CANNON et al., 1996). Ein ähnlicher Bericht erhob bei 2,43% aller untersuchten Schlachttiere Schäden, die durch Injektionen bedingt waren (DANIELS, 2008). In Deutschland existieren keine Zahlen über das Vorkommen von abgebrochenen Injektionsnadeln bei Schlachtschweinen. Das Statistische Bundesamt veröffentlicht aber halbjährlich Ergebnisse der Fleischhygienestatistik, in der die Menge an Fleisch, das nach gründlicher Entfernung von lokal begrenzten Veränderungen noch als genusstauglich beurteilt wird, mit 2,8% beziffert wird. Diese Veränderungen umfassen jedoch allgemein Abszesse, Entzündungen, Ödeme und sogar Gelenkserkrankungen. Das Auftreten von abgebrochenen Kanülen wird nicht explizit aufgelistet (STATISTISCHES BUNDESAMT, 2011).

2.3 Stress

Stress im klinischen Sinne ist die Gesamtheit der Reaktionen des Organismus auf verschiedene unspezifische Reize physischer oder psychischer Art (WIESNER, 2000; PSCHYREMBEL, 2002). Reize psychischer Art werden in der Regel individuell

wahrgenommen, während die Wahrnehmung von Reizen physischer Art, wie schmerzhaftere Ereignisse, ein neurophysiologisch erklärbarer Vorgang ist, der bei allen Säugetieren in der gleichen Form abläuft (VIÑUELA-FERNÁNDEZ et al., 2007). Die Reize bestehen aus diversen Umwelteinflüssen und stellen den sogenannten Stressor dar (LADEWIG, 1994). Deren emotionale und sensorische Wahrnehmung lösen schließlich Stress im Gesamtorganismus aus (ERHARDT und HENKE, 2011). Der Stressor stellt eine Gefährdung der Homöostase eines Individuums dar und löst eine biologische Antwort des Körpers aus, die darauf abzielt, die Homöostase wieder ins Gleichgewicht zu bringen (MOBERG, 2000; CHROUSOS, 2009). Nach KOOLHAAS et al. (2011) übt nahezu jede Aktivität eines Lebewesens direkten oder indirekten Einfluss auf die Homöostase aus und der Organismus ist permanent bestrebt, einen optimalen Gleichgewichtsstatus herzustellen. Daher ergänzen sie die Definition des Begriffes insofern, dass es sich bei den Stressoren zusätzlich um unvorhergesehene oder unkontrollierbare Ereignisse oder Noxen handeln muss. MELLOR et al. (2000) führen neben den Begriffen *Stress* und *Schmerz* den Begriff des *schmerzbedingten Stresses* für den Gebrauch im Bereich von landwirtschaftlichen Nutztieren ein, die durch klinische Eingriffe Gewebeverletzungen erleiden. Sowohl die emotional-psychischen Auswirkungen von Stress als auch die neurophysiologischen Auswirkungen von Schmerzen werden demnach gleichermaßen und untrennbar voneinander von einer biologischen Antwort des Organismus reflektiert.

Nach dem Stressdiagramm von MOBERG (2000) ist die biologische Antwort des Organismus auf einen Stressor durch die Aktivierung von verschiedenen Mechanismen in den folgenden 4 Bereichen gekennzeichnet:

1. Verhalten
2. Autonomes Nervensystem
3. Neuroendokrine Reaktion
4. Immunantwort

Diese Bereiche werden je nach Stressor individuell unterschiedlich stark aktiviert. Durch Fokussierung auf nur einzelne Bereiche kann gemäß der Studien von MOBERG (2000) und JENSEN et al. (1996) keine umfassende Aussage zur Stressreaktion getroffen werden. Es muss ebenfalls berücksichtigt werden, dass intensiver Stress oder Angst die sensorische Wahrnehmung eines schmerzhaften

Eingriffes und die daraus resultierende Stressreaktion steigern kann. Eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Stress aufgrund von schmerzhaften Eingriffen besteht insbesondere für Neonaten (ERHARDT und HENKE, 2011).

Eine statistische Auswertung der Stressreaktion zur Beurteilung der Verträglichkeit bestimmter Eingriffe und Manipulationen am Tier gestaltet sich oft schwierig. Eine Voraussetzung für eine objektive Auswertung ist die Selektion von messbaren Parametern, deren Verlauf mit dem Ausmaß der Stressreaktion korreliert.

Einige Studien bedienten sich in der Vergangenheit der Beobachtung des Verhaltens während der Einwirkung des Stressors. Da die Verhaltensreaktion aber trotz der Einführung von Punktesystemen und Schmerzskalen schwierig sowie oft nur subjektiv zu interpretieren ist, ist sie nur eingeschränkt geeignet um Stress zu quantifizieren (RUSHEN, 2000; ERHARDT und HENKE, 2011).

2.3.1 Stressvariablen

Die gegenwärtigen Fortschritte in der Diagnostik haben ein tiefgreifendes Verständnis über die Vorgänge ermöglicht, die bei schmerzbedingtem Stress im Zentral-nervensystem ablaufen. Die vegetative Komponente der Nozizeption spielt eine Schlüsselrolle bei der Beurteilung der Schmerz- und Stressreaktion anhand von Variablen (KOOLHAAS et al., 2011).

Die vegetative Komponente umfasst die Weiterleitung von nozizeptiven Signalen in Form neurohumoraler Reflexbögen, die den Sympathikus aktivieren und die Freisetzung von Katecholaminen aus dem Nebennierenmark stimulieren. Der unmittelbare zeitliche Zusammenhang neurohumoraler Reflexbögen mit der Noxe dient der Auslösung eines Fluchtreflexes. Des Weiteren wird die vegetative Komponente durch die Verschaltung von noxischen Informationen im Hirnstamm und Hypothalamus vermittelt. Dabei wird die Hypothalamus-Hypophysen-Achse aktiviert, die unter anderem zur Freisetzung von Glukokortikoiden aus der Nebennierenrinde führt (HPA-Achse). Dieser humorale Vorgang findet zeitlich verzögert zu der Unmittelbarkeit der neurohumoralen Reflexbögen statt und steht im Zusammenhang mit dem Heilungsprozess nach einer Noxe (MOLONY und KENT, 1997; SANN, 2009).

Die Botenstoffe, die bei diesen Vorgängen involviert sind stellen geeignete Variablen dar, die bei der Beurteilung von schmerzbedingtem Stress von Nutzen sein können.

Um den akuten Stress von Tieren zu quantifizieren, ist insbesondere die Messung von Hormonen, die mit einer Aktivität der HPA-Achse assoziiert sind von Bedeutung (MORMEDE et al., 2007; MERLOT et al., 2011).

2.3.2 Cortisol

Bei einer stressinduzierten Aktivierung der HPA-Achse durch entsprechende Signale aus dem Hirnstamm wird in den neurosekretorischen Zellen des Hypothalamus das hypophyseotrope Hormon Corticoliberin (CRH) gebildet. Die Fortsätze dieser Zellen enden frei in der Eminentia mediana, einer gefäßreichen Region im Hypophysenstiel. Das CRH gelangt von dort über ein Pfortadersystem in das Kapillarsystem des Hypophysenvorderlappens. Dort induziert es die Sekretion des Adrenocorticotropen Hormones (ACTH) aus den corticotropen Drüsenepithelzellen in den Körperkreislauf. Das ACTH induziert seinerseits die Sekretion des Glucocorticoides Cortisol, aus den Zellen der Nebennierenrinde (GUYTON und HALL, 2006; MÖSTL, 2009).

Cortisol hat sich bei allen Nutztieren gleichermaßen als Stressparameter etabliert. Eine Vielzahl von Studien belegt zusätzlich die Eignung von Cortisol zur Bemessung des schmerzinduzierten Stresses bei klinischen Eingriffen speziell bei Ferkeln (SCHÖNREITER et al., 1999; HAY et al., 2003; PRUNIER et al., 2005; RAULT et al., 2011). Das Hormon Cortisol ist für Studien zum schmerzinduzierten Stress besonders wertvoll, da es im Gegensatz zu anderen Variablen die Reaktion sowohl auf emotional als auch mechanisch belastende Eingriffe reflektiert (MELLOR et al., 2000; CHROUSOS, 2009).

Durch mehrere aufeinanderfolgende Blutentnahmen nach der Einwirkung einer definierten Noxe und der Messung der Cortisolkonzentration im Serum können Cortisol-Verlaufskurven erstellt werden, die die Quantität der Stressreaktion bewerten lassen (MELLOR et al., 2000). Eine Messung des Basalwertes vor dem zu bewertenden Eingriff ist Voraussetzung für die Erstellung einer aussagekräftigen Verlaufskurve (MOLONY und KENT, 1997; ERHARDT und HENKE, 2011). Es konnte bei unterschiedlichen Tierarten gezeigt werden, dass bei einem einfachen Kurvenverlauf der Cortisolwert auf einen Maximalwert ansteigt und dann langsam wieder zum Basalwert absinkt. Auszuwerten sind der maximale Anstieg, sowie der relative Anstieg unter Berücksichtigung des Basalwertes, die Dauer bis zum Erreichen des Maximalwertes und bis zum erneuten Abfall auf die Basal-

konzentration, und die Fläche unter der Kurve (DINNISS et al., 1997; MCMEEKAN et al., 1997; MELLOR et al., 2000; KOOLHAAS et al., 2011; MERLOT et al., 2011). Ein isoliert betrachteter Cortisolwert hat wenig Bedeutung für die Messung von Stress, da nur im Kontext einer Verlaufskurve eine adäquate Interpretation des Stressempfindens erfolgen kann (MELLOR et al., 2000).

MERLOT et al. (2011) konnten zeigen, dass die Amplituden der Verlaufskurven von hormonellen Stressparametern mit der Dauer und Intensität der Stressoren korrelieren. In ihrer Studie unterteilten sie Reize in moderate und intensive Stressoren, wobei moderate Stressoren keinen zuverlässigen Anstieg des Cortisols hervorrufen. Intensive Stressoren hingegen bewirken einen reproduzierbaren, signifikanten Anstieg. Auch PRUNIER et al. (2005) beobachteten, dass die Cortisolkonzentration im Plasma nach der Saugferkelkastration um das 4-fache in Relation zur Basalkonzentration anstieg, nach Eingriffen wie dem Schleifen der Zähne oder dem Kupieren des Schwanzes jedoch kaum oder gar nicht. Zur Wirkung von Injektionen auf die Cortisolausschüttung von Schweinen sind bislang keine Studien bekannt.

Neben der Amplitude korreliert auch die Dauer bis zum Erreichen des Maximalwertes mit dem Schweregrad der Gewebeschädigung. Plötzliches Durchtrennen von Gewebeverbänden führt zu einem raschen Anstieg, während Maßnahmen, die ein Auftreten von Nekrosen im Gewebe nach sich ziehen, einen flacheren Anstieg bewirken (MELLOR et al., 2000).

Im Falle der Saugferkelkastration wurde die höchste Cortisolkonzentration im Plasma zwischen 30 und 60 Minuten nach dem Eingriff erreicht (PRUNIER et al., 2005). In den Untersuchungen von MERLOT et al. (2011) hingegen wurden die Maximalwerte bereits 15 Minuten nach Stressbelastungen wie Fixierung, Elektroschock, Lärm, dem Einziehen von Ohrmarken, Tätowierung und der Entnahme von Hautbiopsien gemessen. In beiden Studien wurde der Basalwert nach 3 Stunden wieder erreicht. Manche Studien berichteten auch von einem länger dauernden Absinken der Konzentration auf den Basalwert von mehr als 6 Stunden (EARLEY und CROWE, 2002). Alle bekannten Studien bestätigten jedoch ein Absinken der Cortisolkonzentration auf den Basalwert nach spätestens 24 Stunden.

Die Angaben zur physiologischen Basalkonzentration des Cortisols im Ruhezustand variieren bisweilen stark. Lange Zeit unterschied man zwischen hohen Werten bei

stressempfindlichen Tieren von 37,0 ng/ml (entsprechen ca. 102 nmol/l) und niedrigen Werten bei Tieren mit hohem Fettanteil von 25,7 ng/ml (entsprechen ca. 71 nmol/l) (GÜRTLER, 1987). Neuere Studien gaben für Saugferkel Serum-Basalwerte im Bereich von 61,3 – 91,3 nmol/l an, die altersabhängig schwanken (KANITZ et al., 2011). Die Basalwerte hängen zudem vom Stress der Muttersauen während der Trächtigkeit ab und können daher wurfweise variieren (OTTEN et al., 2001; KANITZ et al., 2003).

Zusätzlich sind für diese Basalwerte tageszeitliche Schwankungen zu berücksichtigen. Insbesondere für Cortisol wurde nachgewiesen, dass die Blutkonzentration morgens am stärksten schwankt. Im Alter von 3 Wochen ist bei Ferkeln dieser zirkadiane Rhythmus noch nicht ausgebildet (RUIS et al., 1997; DE JONG et al., 2000; MERLOT et al., 2011; SKARLANDTOVA et al., 2011). Diese Beobachtungen sind widersprüchlich zu den Aussagen von GALLAGHER et al. (2002), die bei Saugferkeln bereits 6 – 10 Tage nach der Geburt die Tendenz zur Ausprägung einer zirkadianen Rhythmik feststellten.

Der Einfluss des Alters auf die Aktivität der HPA-Achse spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle. Die Höhe der Cortisolausschüttung, also die Amplitude der Verlaufskurve, korreliert negativ mit dem Alter der Ferkel. So wurden bei Stimulationsversuchen mit exogen verabreichtem ACTH bei 3 Tage alten Saugferkeln höhere Cortisolanstiege beobachtet als bei 7, 21 und 35 Tage alten Saugferkeln. Auch die Basalkonzentration im Ruhezustand nimmt bei Tieren mit steigendem Alter von 3, 7, 21 und 35 Tagen ab. In derselben Studie konnten auch Unterschiede zwischen den Geschlechtern nachgewiesen werden. Bei Saugferkeln im Alter von 3 Tagen wurden bei männlichen Tieren höhere Basalkonzentrationen gemessen als bei weiblichen Tieren. Dieser Unterschied verringerte sich jedoch mit zunehmendem Alter und war im Alter von 21 Tagen nicht mehr nachweisbar (OTTEN et al., 2001; KANITZ et al., 2003).

2.4 Gewebeläsionen

Medizinische Eingriffe am Tier können sowohl durch ihre Stressantwort beurteilt werden als auch anhand tatsächlicher Gewebeschäden. Zum Nachweis von lokalen Gewebeläsionen nach intramuskulärer Injektion von Arzneimitteln eignet sich die Untersuchung des Aktivitätsanstieges der sogenannten Muskelenzyme.

Einer dieser Bestandteile ist die Creatinkinase (CK), deren Serumkonzentration als Indikator für das Ausmaß von Muskelfaserschäden geeignet ist (KERN, 1987; LEFEBVRE et al., 1996; CHAVEZ MORENO und BICKHARDT, 1997).

2.4.1 Creatinkinase

Am Häufigsten wird bei klinischen Studien zur Beurteilung von Gewebeläsionen die Creatinkinase (CK) verwendet. Insbesondere als Indikator von Muskeldegenerationen nach intramuskulären Injektionen wird dieser Parameter als zuverlässig beschrieben (LEFEBVRE et al., 1996; CHAVEZ MORENO und BICKHARDT, 1997). Der Anstieg der CK erfolgt abhängig von der Größe des betroffenen Gebietes und dem Schweregrad der Läsionen (FLÜCKIGER, 1977). Bei Defekten am Sarkolemm der Muskelzellen gelangen muskelspezifische Enzyme, wie die CK, vermehrt in die extrazelluläre Flüssigkeit und von dort aus in den Blutkreislauf (SZENTKUTI, 2009). Für die Beurteilung des Zerstörungsgrades der Skelettmuskulatur ist von den drei im Organismus vorkommenden Isoenzymen der Creatinkinase die CK-MM von Bedeutung, da die anderen beiden Isoenzyme nur im Gewebe des Zentralnervensystems (CK-BB) und im Herzmuskel vorkommen. Das Isoenzym CK-MM macht mit 70-90% den Hauptteil der gesamten Serum-Aktivität aus. Im Hinblick auf eine CK-Aktivitätssteigerung nach Belastung im Vergleich zum Basalwert gilt, dass erhöhte CK-total-Aktivitäten im Plasma im Wesentlichen durch muskelspezifische CK verursacht werden. Da die CK-Gesamtaktivität beim Schwein stark mit der Aktivität der CK-MM korreliert, genügt bei der Labordiagnostik die Messung der CK-Gesamtaktivität im Plasma, die im Folgenden mit der Aktivität der CK-MM gleichgesetzt wird. Für die Messung des CK-Wertes kann sowohl Blutserum als auch Blutplasma verwendet werden (BICKHARDT und SCHWABENBAUER, 1981; KRAFT, 2006b).

HEINRITZI (2006b) sowie KRAFT (2006b) geben bei Schweinen normale Basalkonzentrationen zwischen 100 – 2000 U/l an, die jedoch abhängig von Rasse, Alter und Belastung stark variieren können. Nicht nur die Rasse ist ausschlaggebend, sondern auch die Stressempfindlichkeit. So ist die Enzymaktivität nach Stressbelastung bei stressempfindlichen Schweinen höher als bei unempfindlichen (BICKHARDT und SCHWABENBAUER, 1981; HEINRITZI und PLONAIT, 2004).

Eine geringgradige Erhöhung der CK wird mit einem zwei- bis dreifachen Anstieg gleichgesetzt, eine mittelgradige Erhöhung mit einem 4- bis 10-fachen Anstieg und eine hochgradige Erhöhung entspricht einem mehr als 10-fachen Anstieg der Normalwerte (MCGAVIN und MCGAVIN, 2009).

Die Angaben zum Zeitpunkt des maximalen Aktivitätsanstieges der CK im Serum nach Setzen einer Gewebeläsion variieren je nach Autor. Die Halbwertszeit der im Blut zirkulierenden CK liegt tierartspezifisch zwischen sechs und zwölf Stunden. So fanden bei CHAVEZ MORENO und BICKHARDT (1997) die Blutabnahmen 4, 8, 24 und 48 Stunden nach der Belastung statt. Der maximale Anstieg lag bei 24 Stunden. Dieser Zeitpunkt stimmt mit den Ergebnissen von GROCHOLL und BICKHARDT (1988) überein, gemäß deren Untersuchungen für Mastschweine von 60 – 80 kg maximale CK-Konzentrationen 16 – 24 Stunden nach einer experimentellen Stressbelastung, in Form von subkutanen Injektionen mit Neostigminbromid und Atropinsulfat, gemessen wurden. Vereinzelt weisen jedoch Studien auf die Altersabhängigkeit dieser Werte hin. Je jünger die Schweine sind und desto größer ihre tägliche relative Gewichtszunahme ist, desto schneller nach einer Belastung wird die maximale CK-Aktivität im Serum erreicht und desto früher wird die zirkulierende CK wieder abgebaut. So wurde die maximale CK-Konzentration bei Läufern von 24 – 40kg hingegen bereits 4 – 8 Stunden (GROCHOLL und BICKHARDT, 1988) bzw. 6 – 10 Stunden (KRUFF und FRAHM, 1984) nach der Belastung gemessen. In den Untersuchungen von ELICKER (2006) wurden bei Saugferkeln (3. – 28. Lebenstag) bereits 4 Stunden und bei Absetzferkeln (4. – 12. Lebenswoche) 4 – 8 Stunden nach einer intramuskulären Injektion Maximalwerte für die CK-Konzentration festgestellt. Ein Anstieg der CK nach Injektion ist abhängig von der Art des applizierten Injektionspräparates. So rief bei den Untersuchungen von CHAVEZ MORENO und BICKHARDT (1997) unabhängig von der Injektionsmethode die intramuskuläre Injektion eines Terramycin-Präparates einen signifikanten Anstieg der CK hervor, während eine Injektion von isotonischer Kochsalzlösung keinen Anstieg nach sich zog.

2.4.2 Aspartataminotransferase

Die Aspartataminotransferase (AST) ist ebenso wie die CK in hohen Konzentrationen in den Zellen der Muskelfasern enthalten, wobei die Konzentration in den roten

Muskelfasern wesentlich höher ist als in den weißen. Die AST kommt aber auch im Lebergewebe vor. Daher sind die AST-Aktivitäten im Blut sowohl bei Läsionen der Skelettmuskulatur als auch der Leber erhöht.

Die Normalkonzentration bei Schweinen liegt zwischen 8 – 35 U/l (HEINRITZI und PLONAIT, 2004; KRAFT und DÜRR, 2006). Ein Anstieg bis zum Dreifachen der Basalkonzentration wird mit einer geringgradigen Erhöhung gleichgesetzt und über das Dreifache als mittel- bis hochgradige Erhöhung. AST wird in der Regel nie isoliert bestimmt sondern hauptsächlich zur Bestimmung des Verhältnisses zur CK, um Muskel- von Leberkrankheiten zu differenzieren (KRAFT und DÜRR, 2006). Eine Erhöhung von AST bei erhöhter CK weist auf einen Muskelschaden hin (THOMAS, 2008).

2.4.3 CK/AST Quotient

Da bei einer Läsion der Skelettmuskulatur die in den Muskelzellen enthaltenen Enzyme zu gleichen Teilen frei werden, bietet der Quotient aus CK und AST die besten Informationen zur Differenzierung von Skelettmuskel-, Herzmuskel- und Leberschäden beim Schwein. Bei einem Anstieg der CK oder der AST bei einem Quotienten von ~50 kann man von einer Muskeldegeneration ausgehen. Ein Quotient von >50 spricht dafür, dass vermehrt weiße Muskelfasern und von 20 – 50, dass vermehrt rote Muskelfasern betroffen sind. Ist der Quotient <20 geht man von einer Leberzellschädigung aus (BICKHARDT und SCHWABENBAUER, 1981; BICKHARDT, 2004). Auch aus den normalen Basalwerten lässt sich ein Quotient von <20 errechnen.

2.5 Lokalreaktion

Injektionen verursachen je nach Eigenschaften des Injektionspräparates, Injektionsvolumen und Injektionsverfahren eine mehr oder weniger ausgeprägte Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle (CHAVEZ MORENO und BICKHARDT, 1997; ELICKER, 2006). Eine akute Entzündung dauert nur wenige Stunden bis einige Tage und wird dann von einer Regeneration und Heilung des Gewebes abgeschlossen. Eine chronische Entzündung tritt als Folge einer akuten Entzündung auf, wenn der auslösende Stimulus persistiert. Erst nach einer Dauer von Wochen spricht man von chronischer Entzündung (ACKERMANN, 2009a).

2.5.1 Makroskopisch

Diese Entzündungsreaktion lässt sich anhand der Kardinalsymptome Rötung, Schwellung, Erwärmung, Schmerz und Funktionsverlust bereits makroskopisch erkennen und beurteilen (MEURER, 2007).

So treten bei der intramuskulären Verabreichung von gewebereizenden Arzneimitteln gering- bis mittelgradige Verhärtungen der Injektionsstelle auf, die mit dem Anstieg der CK-Konzentration im Blut korrelieren (CHAVEZ MORENO und BICKHARDT, 1997). Nach der Verabreichung von isotonischer Kochsalzlösung hingegen konnten keine makroskopisch sichtbaren Lokalreaktionen festgestellt werden.

2.5.2 Histologisch

Die oben genannten Kardinalsymptome entsprechen einer entzündlichen Hyperämie, der Ansammlung von flüssigem und zellulärem Exsudat, gesteigerten Stoffwechselvorgängen und einer mechanischen und chemischen Irritation der Nerven (MEURER, 2007). Histologisch sind bei einer akuten Entzündung Gefäßveränderungen, Ödem, Fibrin und überwiegend neutrophile Granulozyten nachweisbar (BAUMGÄRTNER, 2007; ACKERMANN, 2009a). Nach dieser Phase kann eine persistierende Noxe mit andauerndem Gewebeuntergang zu einer chronischen Entzündung führen, die durch das Auftreten von Makrophagen, Lymphozyten, Plasmazellen und mehrkernigen Riesenzellen charakterisiert ist (BAUMGÄRTNER, 2007; ACKERMANN, 2009b). Das Auftreten von injektionsbedingten Nekrosen ist zum einen mechanisch durch die bei der Penetration des Gewebes einwirkenden Kompressions- und Scherkräfte bedingt (ARORA et al., 2007), und zum anderen von den gewebereizenden und entzündlichen Eigenschaften des Injektionspräparates abhängig (CHAVEZ MORENO und BICKHARDT, 1997). Wenn der proinflammatorische Stimulus vollständig eliminiert werden kann, kommt es zu Regenerationsversuchen des Gewebes im Sinne von Zellteilung, daneben Apoptose der Leukozyten und Entfernung des Exsudates durch Makrophagen (MCGAVIN und MCGAVIN, 2009). Wenn ein gewebereizendes Arzneimittel oder mit der Injektion eingedrungenes Fremdmaterial hingegen als inflammatorischer Stimulus persistiert, können granulomatöse Entzündungsvorgänge mit einer kontinuierlichen Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Leukozyten, Makrophagen, Plasmazellen und mehrkernigen Riesenzellen über einen längeren Zeitraum andauern. Dies kann

wiederum in einer Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen sowie der Synthese von Kollagenfasern zur Ausbildung eines bindegewebigen Ersatzgewebes im Zuge des Heilungsprozesses resultieren (ACKERMANN, 2009b).

Eine aktuelle Studie über die entzündlichen Vorgänge an der Injektionsstelle nach nadelloser Injektion bei Schweinen stammt von JONES et al. (2005). Klinisch auffällige Injektionsstellen wurden 21 und 36 Tage nach einer Impfung gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* histologisch untersucht. Das verwendete Injektionsvolumen der Vakzine betrug dabei lediglich 0,1 ml. Bei der histologischen Untersuchung wurden nur geringgradige, fokal begrenzte mikroskopische Läsionen festgestellt. Diese bestanden aus perivaskulären lymphoplasmazellulären Infiltraten bis hin zu moderaten granulomatösen Entzündungsherden in der Dermis sowie Ansammlungen von Lymphozyten und Makrophagen in der Skelettmuskulatur.

3 Material und Methoden

Die Versuche wurden an der Lehr- und Versuchsstation der Technischen Universität München in Thalhausen und am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt. Die Untersuchungen fanden im Zeitraum von Mai 2011 bis Februar 2012 statt.

Das Vorhaben wurde nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes bei der Regierung von Oberbayern genehmigt und ist dort unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2532-34-11 hinterlegt.

3.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienten Schweine (Mast-Hybriden: Deutsche Landrasse x Pietrain) aus der betriebseigenen Nachzucht der Lehr- und Versuchsstation der Technischen Universität München in Thalhausen.

Die Haltung der Tiere erfolgt in dieser Anlage entsprechend den Maßgaben der Verordnung über hygienische Anforderungen beim Halten von Schweinen und der Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung unter Berücksichtigung des Anhangs A des Europäischen Übereinkommens zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Wirbeltiere.

Die Ferkel sind während der Sägezeit von 28 Tagen zusammen mit dem jeweiligen Muttertier in einer Abferkelbucht mit Kastenstand untergebracht. Die Haltung erfolgt auf Spaltenboden, der in der vorderen Hälfte des Liege- und Fressbereiches der Sau mit einer Gummimatte ausgelegt ist. In diesem Bereich befindet sich das Ferkelnest, das nach oben von einer Abdeckung begrenzt ist und mit einer Infrarot-Wärmelampe ausgestattet ist. Der Boden des Ferkelnestes ist mit einer Fußbodenheizung ausgestattet und mit Sägespänen eingestreut.

Die Muttertiere werden 10 Tage vor dem errechneten Geburtstermin in die Abferkelbuchten verbracht.

Die neugeborenen Ferkel werden am Tag nach der Geburt mit einer Ferkelohrmarke versehen. Gleichzeitig werden die Eckzähne geschliffen und die Schwänze mit einem elektrischen Kupiergerät gekürzt. Am dritten Lebenstag erhalten sie 200 mg Eisendextran (*Ursoferran*[®] 100 mg/ml pro inj., Serumwerk Bernburg AG.) per

subkutaner Injektion in die Kniefalte. Die Kastration erfolgt am 5. – 7. Lebenstag wobei die intramuskuläre Injektion von 0,2 ml Meloxicam (*Metacam[®] 5 mg/ml, Injektionslösung, Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH*) auf die linke Seite der Nackenmuskulatur platziert wurde. Für die Injektion von Meloxicam wurden 25 mm lange Kanülen der Größe 21 G verwendet.

Den Saugferkeln wird einige Tage nach der Geburt Milchaustauscher im Napf angeboten und ab der 2. Lebenswoche zusätzlich Prestarter-Futter. Neben dem Milchaustauscher haben die Ferkel zu jeder Zeit freien Zugang zu Wasser.

3.2 Versuchsvorhaben

Ziel des Versuchsvorhabens war es, die nadellose Injektion und die konventionelle Injektion mit Kanüle vergleichend zu beurteilen. Dazu wurden die Verträglichkeit der Injektionsverfahren und die Resorption der applizierten Arzneimittel untersucht.

Die Verträglichkeit wurde anhand der Stressreaktion und den entstehenden Gewebeschäden bestimmt. Zur Beurteilung der Stressreaktion diente der Laborparameter Cortisol. Die Untersuchung der entstehenden Gewebeschäden erfolgte durch die Auswertung der Laborparameter CK und AST, der klinischen Untersuchung der Lokalreaktion und der pathohistologischen Untersuchung der Injektionsstelle. Die Resorption der applizierten Arzneimittel wurde durch Messung der Arzneimittelkonzentration im Serum bestimmt.

3.2.1 Injektionspräparate

Die Verträglichkeit der Injektion sollte in Abhängigkeit von der Viskosität des Injektionspräparates beurteilt werden. Daher wurden folgende drei Arzneimittel unterschiedlicher Viskosität ausgewählt:

- **Natriumchlorid Trägerlösung 0,9%** (*Serumwerk Bernburg*)
Wirkstoff: Natriumchlorid
- **Myofer[®] 200** (*MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim*)
Wirkstoff: Eisen(III)-hydroxid-Dextran, Sonstige Bestandteile: Phenol
- **Vitamin-E-Selen-Lösung[®]** (*CP-Pharma, Burgdorf*)
Wirkstoffe: Alpha-Tocopherolacetat, Natriumselenit (wasserfrei)
Sonstige Bestandteile: Benzylalkohol, Phenol

Die Messung der Resorption des applizierten Arzneimittels wurde lediglich im Falle von Eisendextran durchgeführt, da nur bei diesem Präparat die Verfügbarkeit im Blut gemessen werden kann.

3.2.2 Viskositätsmessung

Die Messung der Viskosität der verwendeten Arzneimittel wurde am Institut für Lebensmittelverfahrenstechnik am Wissenschaftszentrum Weihenstephan der Technischen Universität München durchgeführt. Für die Messungen wurde ein *Advanced Rheometer AR 1000* der Firma *TA Instruments* verwendet. Als Messgeometrie wurde eine Kegel-Gegen-Platte-Anordnung gewählt. Die Geometrie bestand aus einem DIN Rotor in Form eines konzentrischen Zylinders mit kegelförmiger Spitze (Kegel) und einem zylindrischen Außengefäß mit ebenem Gefäßboden (Platte). 15 ml der zu messenden Flüssigkeit wurden in die Messgeometrie eingebracht, deren Temperatur auf 22,5°C eingestellt wurde. Dies entspricht der Temperatur des Arzneimittels zum Zeitpunkt der Injektion nach Lagerung bei Raumtemperatur. Der konzentrische Drehrotor wurde in das Außengefäß abgesenkt, bis ein definierter Abstand von 5 mm zwischen Kegel und Platte erreicht wurde. Beim Absenkvorgang verdrängte der Drehrotor die Flüssigkeit, bis er gerade von ihr bedeckt wurde. Die exakte Geometrie ließ einen spaltförmigen Abstand zwischen Rotor und Außengefäß entstehen, in dem sich ein Flüssigkeitsfilm bildete. Die Geometrie begann zu rotieren und beschleunigte innerhalb von 1 Minute auf eine Schergeschwindigkeit ($\dot{\gamma}$) von 100/s. Die Schergeschwindigkeit wurde logarithmiert und pro Dekade 15 Messungen der Scherspannung (τ) vorgenommen. Aus den Werten der Scherspannung und Schergeschwindigkeit wurde der Wert für die dynamische Viskosität (η) in Pa·s berechnet.

3.2.3 Applikation der Injektionspräparate

Die intramuskuläre Injektion wurde bei horizontaler Applikationsrichtung in die seitliche Halsmuskulatur auf Höhe des oberen Ohrgrundes am Übergang von glatter Haut zum lockeren Bereich des Ohrgrundes vorgenommen. Das Injektionsvolumen betrug 2 ml.

3.2.3.1 Injektion mit Nadel

Bei der Injektion mit Nadel wurden 25 mm lange Kanülen der Größe 19 G (entspricht einem Kanüledurchmesser von 1,1 mm) verwendet. Die verwendete Injektionspritze (*HSW Eco-Matic®*, 2ml) ermöglichte eine exakte Dosierung des Injektionspräparates auf 2 ml.

3.2.3.2 Nadellose Injektion per Druckluft

Für die nadellose Injektion wurde das Gerät *Pulse® 250* (*Pulse Needlefree Systems*, Kansas, USA, Vertrieb durch *Schippers*, Kerken) verwendet (Abbildung 1). Das Gerät besteht aus einer Druckquelle, einer Dosiereinheit und dem Injektions-Handstück. Als Druckquelle wurde ein Kompressor (Betriebsdruck 8 bar) verwendet. Der Kompressor war über einen Verlängerungsschlauch an der Dosiereinheit angeschlossen und außerhalb des Stallabteiles aufgestellt, um die Ferkel von der Lärmbelastung während dem Vorgang des Druckaufbaues abzuschirmen. Messungen zur Dauer und der Höhe des Lärmpegels bei diesem Vorgang wurden einmalig zu Versuchsbeginn durchgeführt. Der für die Injektion nötige Druck wurde in der Dosiereinheit mit Überdruckventil gespeichert. In die Dosiereinheit des Gerätes war eine 2 ml-Dosierkartusche eingesetzt, die ein konstantes Injektionsvolumen von 2ml pro Injektion vorgab. Über einen Druckregler an der Dosiereinheit konnte der Injektionsdruck manuell eingestellt werden.

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, wurde der Injektionsdruck gemäß den Angaben des Herstellers an die Größe der Tiere sowie der Viskosität des verwendeten Injektionspräparates angepasst.

Tabelle 1 — Druckeinstellung *Pulse® 250* für Saugferkel verschiedener Altersgruppen und unterschiedlicher Viskosität der Injektionspräparate

Injektionsdruck		
Injektionspräparat	3. Lebenstag	14. Lebenstag
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	1,7 bar	2,4 bar
Myofer® 200	2,1 bar	3,0 bar
Vitamin-E-Selen-Lösung®	2,4 bar	3,1 bar

Auch das Injektions-Handstück wurde an die Größe der Tiere angepasst. Das für Saugferkel vorgesehene Handstück hat einen Düsendurchmesser von 0,27 mm.

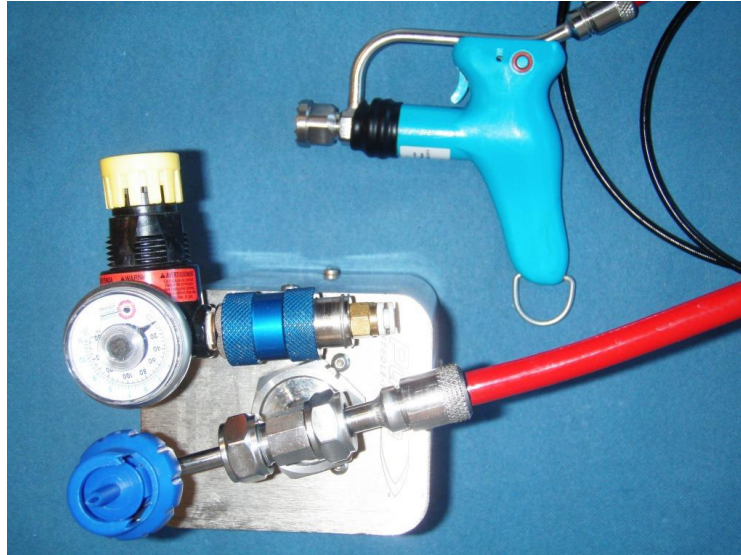


Abbildung 1 – *Pulse[®] 250* (*Pulse Needlefree Systems, Kansas, USA*): Dosiereinheit (2 ml) mit Überdruckventil und manueller Injektionsdruckregulierung verbunden mit Hochdruckleitung zum Handstück zur nadellosen Injektion

3.3 Versuchsgruppen

Der Versuch wurde in zwei Teilversuche aufgeteilt. Im ersten Teilversuch wurden die Auswirkungen der Injektion durch eine klinische Untersuchung beurteilt. Die klinische Untersuchung umfasste die Bewertung der Lokalreaktion an der Injektionsstelle sowie die Auswertung einer Auswahl von Laborparametern nach mehrmaliger Blutentnahme. Im zweiten Teilversuch wurden die Versuchstiere nach der Injektion euthanasiert, um die Injektionsstelle pathohistologisch zu untersuchen.

3.3.1 Klinische Untersuchung

Dieser Teilversuch umfasste 248 Tiere. Die Versuchstiere wurden in 8 Untergruppen eingeteilt, die jeweils aus 31 Saugferkeln bestanden. 4 Versuchsgruppen erhielten eine nadellose Injektion und die anderen 4 Versuchsgruppen eine konventionelle Injektion mit Kanüle. 2 Gruppen bestanden aus Saugferkeln im Alter von 3 Lebenstagen, die eine Injektion mit Eisendextran erhielten. Die anderen 6 Gruppen

bestanden aus Saugferkeln im Alter von 14 Lebenstagen, von denen jeweils 2 Gruppen eine Injektion mit Eisendextran-Injektionslösung, isotonischer Kochsalzlösung oder Vitamin-E-Selen-Lösung erhielten. Tabelle 2 zeigt eine Übersicht dieser Versuchsgruppen.

Tabelle 2 – Gruppeneinteilung für die klinischen Untersuchungen

Nadel			nadellos		
	n	Injektionspräparat		n	Injektionspräparat
Gruppe 1	31	Myofer® 200 (Eisendextran)	Gruppe 2	31	Myofer® 200 (Eisendextran)
Gruppe 3	31	Myofer® 200 (Eisendextran)	Gruppe 4	31	Myofer® 200 (Eisendextran)
Gruppe 5	31	Vitamin-E-Selen-Lösung	Gruppe 6	31	Vitamin-E-Selen-Lösung
Gruppe 7	31	Isotonische Kochsalzlösung	Gruppe 8	31	Isotonische Kochsalzlösung

3.3.1.1 Einschluss

Die Ferkel von klinisch unauffälligen Sauen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn klinisch untersucht, gewogen und anschließend nach Gewicht und Geschlecht randomisiert in die Versuchsgruppen eingeteilt. Jedes Ferkel eines untersuchten Wurfes wurde mit einer fortlaufenden Nummer markiert, die mit wasserfestem Filzschreiber auf den Rücken der Tiere geschrieben wurde.

Ferkel die das Durchschnittsgewicht (Median) des Wurfes um 16% unterschritten, wurden nicht in die Versuchsgruppen aufgenommen. Das mittlere Gewicht (Median) der ersten Untergruppe (3. Lebenstag) variierte von 1,7 – 1,9 kg, und das der zweiten Untergruppe (14. Lebenstag) von 4,1 – 5,0 kg. Diese Werte sind konform mit den Gewichtsanforderungen für gesunde Ferkel dieser Altersklasse (STALLJOHANN, 2010). Saugferkel, die nicht klinisch gesund waren oder deren Allgemeinbefinden reduziert war, wurden von der Versuchseinteilung ausgeschlossen.

Saugferkel der Gruppen, die für eine Injektion von Eisendextran am dritten Lebenstag vorgesehen waren, hatten vor dem Injektionsversuch noch kein Eisendextran erhalten. Bei den Würfen, die für den Injektionsversuch im Alter von 14 Lebenstagen in Frage kamen, wurde das am 3. Lebenstag verabreichte Eisendextran subkutan in die Kniefalte injiziert. Bei denselben Tieren wurde bei der Saugferkelkastration das Schmerzmittel in die Halsmuskulatur der linken Körperseite injiziert.

3.3.1.2 Versuchsablauf

Zu Beginn des Versuchsablaufes wurde von jedem Ferkel für die Messung der Basalwerte der Laborparameter eine Blutprobe entnommen. Zur Blutentnahme aus der Vena cava cranialis wurden *Primavetten® V* (*Kabe Labortechnik GmbH, Nümbrecht*) und Kanülen der Größe 20 G (entspricht einem Kanülendurchmesser von 1,1 mm) verwendet. Unmittelbar nach der Blutentnahme wurde das jeweilige Präparat mittels Nadel oder *Pulse®* in die Halsmuskulatur der rechten Körperseite injiziert. Im Folgenden fand bei jedem Versuchstier eine Blutabnahme je 30 Minuten, 1 Stunde, 4 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion statt. Zusätzlich zur Blutabnahme wurde 4 Stunden und 24 Stunden nach Injektion die Injektionsstelle untersucht, um die Lokalreaktion zu bewerten. Bei den Tieren im Alter von 3 Lebenstagen, die der Versuchsgruppen 1 und 2 zugehörig waren, fanden weitere Blutabnahmen mit Bewertung der Injektionsstelle am 7., 14., 21. und 28. Tag nach der Injektion statt. Bei der Blutabnahme zu den Zeitpunkten 14. und 28. Tag nach der Injektion wurde zudem das Gewicht der Ferkel kontrolliert.

3.3.1.3 Laborparameter

Die Blutproben wurden nach der Blutentnahme in Eiswasser gekühlt. Noch am selben Tag wurden sie 10 Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert, und aus dem gewonnenen Serum zwei Aliquots zu je 0,5 ml und eine Rückstellprobe zu 1 ml hergestellt. Diese wurden bei -22 °C bis zur Messung der Laborparameter asserviert, nicht jedoch länger als 4 Wochen.

Die Messung der Cortisolwerte aus dem Serum erfolgte im Labor der Klinik für Schweine der LMU München. Für die Messungen mittels Elektrochemilumineszenz-Immunoassay (ECLIA) mit einem speziellen Messreagenz (*Cortisol Elecsys®*, *Roche Diagnostics*, Mannheim) wurde das Gerät *Elecsys 2010®* (*Roche Diagnostics*, Mannheim) verwendet.

Die Messung der CK, der AST und des Eisengehalts im Serum erfolgte im Labor der Klinik für Wiederkäuer der LMU München. Die Werte dieser Parameter wurden mittels Photometrie in einem Analysator für klinische Chemie (*Hitachi 912®*, *Roche Diagnostics*, Mannheim) gemessen. Für die Messungen wurden die vom Hersteller empfohlenen Reagenzien (*Roche Diagnostics*, Mannheim) verwendet.

3.3.1.4 Lokalreaktion

Die Injektionsstelle wurde bei allen Versuchstieren 4 Stunden und 24 Stunden und bei der Versuchsgruppe der Saugferkel im Alter von 3 Lebenstagen zusätzlich 7 Tage nach der Injektion beurteilt. Die Untersuchung wurde stets von derselben Person vorgenommen. Die Bewertung der Lokalreaktion erfolgte in Anlehnung an den von ELICKER (2006) verwendeten Beurteilungsschlüssel. Die zu beurteilenden Kriterien waren die Verfärbung, Verhärtung / Konsistenz, Schwellung / Umfangsvermehrung, Ausdehnung in cm und das Auftreten von Blutungen an der Injektionsstelle. Die Quantifizierung der Veränderung wurde durch die Vergabe von Punkten nach folgendem Schema vorgenommen:

0 = keine Veränderung

1 = andeutungsweise verändert

2 = geringgradig verändert

3 = mittelgradig verändert

4 = hochgradig verändert

Tabelle 3 – Bewertung der Lokalreaktion anhand eines klinischen Scores

	Allgemein- befinden	Ausdehnung in cm	Umfangs- vermehrung	Verfär- bung	Verhär- tung	Blutung
4 h						
24 h						
7 d						
SUMME						

Zu den angegebenen Untersuchungszeitpunkten wurden für jedes Merkmal 0 bis 4 Score-Punkte vergeben. Der Gesamtscore pro Tier für ein Merkmal ergab sich aus der Summe aller Punkte, die zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten ermittelt wurden. Bei den 3 Tage alten Saugferkeln der Versuchsgruppen 1 und 2 ergab sich damit ein möglicher Gesamtscore von 0 bis 12 Punkten und bei den 14 Tage alten Saugferkeln der Versuchsgruppen 3 bis 8 ein möglicher Gesamtscore von 0 bis 8 Punkten. Da die Blutung unmittelbar nach der Injektion auftrat und nur einmalig zu diesem Zeitpunkt zu beurteilen war, ergab sich hier für alle

Versuchsgruppen nur ein Gesamtscore von 0 bis 4 Punkten. Beim Merkmal Ausdehnung in cm wurde statt der Summe der höchste gemessene Wert als Gesamtscore verwendet.

3.3.2 Pathohistologische Untersuchung

Dieser Teilversuch umfasste 36 Saugferkel im Alter von 14 Lebenstagen. Die Versuchstiere wurden in 6 Gruppen eingeteilt, die jeweils aus 6 Saugferkeln bestanden. Jeweils 2 Gruppen erhielten eine Injektion mit Eisendextran, isotonischer Kochsalzlösung oder Vitamin-E-Selen. Pro Injektionspräparat gab es zwei Gruppen, von denen die erste eine nadellose Injektion und die zweite eine konventionelle Injektion per Kanüle erhielt.

Eine weitere Unterteilung dieser 6 Versuchsgruppen erfolgte hinsichtlich der Dauer vom Zeitpunkt der Injektion bis zur Euthanasie, wobei die eine Hälfte jeder Gruppe die Injektion 24 Stunden und die andere Hälfte 7 Tage vor der Euthanasie erhielt. Tabelle 4 zeigt eine Übersicht dieser Versuchsgruppen.

Tabelle 4 – Gruppeneinteilung für die pathohistologische Untersuchung

Injektions-Zeitpunkt	Nadel		nadellos	
	n	Injektionspräparat	n	Injektionspräparat
7 d vor Euthanasie	3	Myofer® 200 (Eisendextran)	3	Myofer® 200 (Eisendextran)
	3	Vitamin-E-Selen-Lösung	3	Vitamin-E-Selen-Lösung
	3	Isotonische Kochsalzlösung	3	Isotonische Kochsalzlösung
24 h vor Euthanasie	3	Myofer® 200 (Eisendextran)	3	Myofer® 200 (Eisendextran)
	3	Vitamin-E-Selen-Lösung	3	Vitamin-E-Selen-Lösung
	3	Isotonische Kochsalzlösung	3	Isotonische Kochsalzlösung

3.3.2.1 Einschluss

Die Ferkel von klinisch unauffälligen Sauen wurden vor der Injektion klinisch untersucht, gewogen und anschließend in die Versuchsgruppen eingeteilt. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, bei denen vorberichtlich noch keine intramuskuläre Injektion stattgefunden hatte. Die Halsmuskulatur der ausgewählten Tiere wurde palpatorisch auf Unregelmäßigkeiten und Verhärtungen untersucht. Waren alle Untersuchungen unauffällig, wurde das Tier in die

Versuchsgruppen eingeteilt. Jedes Versuchstier wurde mit einer nummerierten Versuchsohrmarke am rechten Ohr gekennzeichnet.

3.3.2.2 Versuchsaufbau

Die Haut der linken Nackenseite wurde im Bereich der Injektionsstelle großflächig nass rasiert und anschließend abgetrocknet. Die Injektionsstelle wurde markiert indem mittels einer mit Tätowierfarbstoff getränkten Kanüle per Stichinzision vier Punkte im Abstand von 2 cm von der Injektionsstelle entfernt gesetzt wurden. Diese Punkte waren auch noch zum Zeitpunkt der Euthanasie 7 Tage nach der Injektion und nach Abklingen der makroskopisch erkennbaren Lokalreaktion sichtbar. So konnte bei der Sektion die Injektionsstelle durch Verbindung der 4 Punkte in Form eines Kreuzes gut lokalisiert werden. Bei allen Tieren wurde vor der Euthanasie eine einmalige Untersuchung der klinisch sichtbaren Lokalreaktion an der Injektionsstelle vorgenommen, um eventuelle Unterschiede in der Ausprägung der Entzündungsreaktion mit den später gewonnen Ergebnissen aus der pathohistologischen Untersuchung in Zusammenhang zu bringen. Für die Euthanasie wurde Pentobarbital (*Release® 300 mg/ml, Injektionslösung, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen*) gemäß der Packungsbeilage verwendet. Die euthanasierten Versuchstiere wurden unmittelbar in das Institut für Tierpathologie der LMU München transportiert.

3.3.2.3 Sektion

Die Sektion und anschließende Herstellung der histologischen Präparate erfolgte am Institut für Tierpathologie. Bei allen Tieren wurde eine pathoanatomische Untersuchung vorgenommen. Organproben von Lunge, Leber, Milz, Nieren und Herz wurden zur histologischen Untersuchung entnommen. Zusätzlich wurde der Bereich der Injektionsstelle am Nacken entnommen.

Dazu wurde ein 3 – 4 cm breiter Transversalschnitt der Halsmuskulatur von direkt hinter dem Okziput bis auf Höhe des Überganges zwischen Atlas und Axis angefertigt. Der Transversalschnitt enthielt Anteile des *M. rhomboideus cervicis*, *M. splenius*, *M. longus capitis*, *M. brachiocephalicus* und *M. obliquus capitis*. Bei der Präparation der Halsmuskulatur wurde darauf geachtet, dass der Abstand der markierten Injektionsstelle vom kranialen und kaudalen Rand des

Transversalschnittes jeweils gleich groß war, so dass die Injektionsstelle sich zentral in dem entnommenen Nackenstück befand. Als tributäre Lymphknoten des Halses, seiner Haut und Muskulatur wurden die Nll. cervicales superficiales dorsales präpariert. Zusätzlich wurden auch die Nll. mandibulares präpariert.

3.3.2.4 Zuschnitte der Gewebeproben

Alle Organ- und sonstigen Gewebeproben wurden während der Sektion in 4% Formalinlösung eingelegt und 48 Stunden auf einem Schüttler gelagert. Die Formalinlösung wurde nach 24 Stunden einmalig erneuert.

Anschließend wurden die Organ- und Gewebeproben zur weiteren Verarbeitung in kleinere Teilstücke zugeschnitten und auf Kunststoffkapseln verteilt.

Dafür wurde der rostrale und kaudale Rand des entnommenen Muskelstückes abgeschnitten, sodass die Dicke des Transversalschnittes nur noch ca. 2 cm betrug. Von diesem Transversalschnitt wurde an der Injektionsstelle entlang der Injektionsrichtung ein Block herausgeschnitten, in dem sich zentral die Injektionsstelle befand. Der so entstandene Block hatte, von der Injektionsstelle auf der Haut aus betrachtet, eine Seitenlänge von 20 mm und eine die oberflächliche und tiefe Halsmuskulatur umfassende Gesamtlänge von ca. 50 mm. Dieser Block wurde, wie auf der Abbildung 2 zu sehen ist, beginnend von der Hautoberfläche parallel zu dieser in ca. 4-5 mm dünne Scheiben geschnitten. Der speziell angefertigte Schneide-Rahmen gewährleistet dabei eine gleichbleibende Dicke für alle Scheiben.

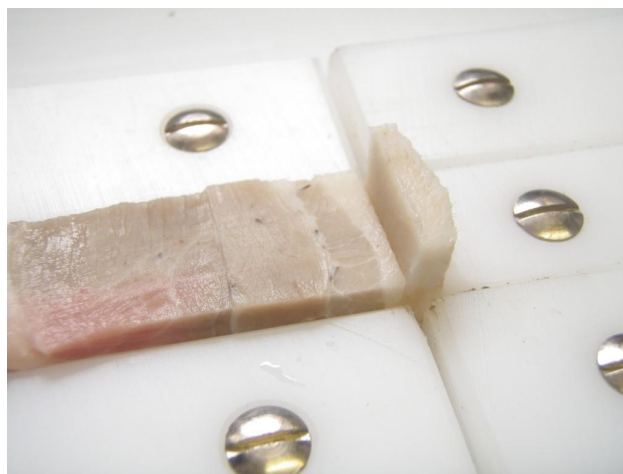


Abbildung 2 — Herstellung von 4-5 mm dünnen Scheiben aus dem Gewebe an der Injektionsstelle, beginnend von der Seite der Hautoberfläche

Die breiten Oberflächen dieser Scheiben bildeten die Ebenen für die mikroskopische Untersuchung der Injektionsstelle. Die erste Untersuchungsebene befand sich 4-5 mm unter der Hautoberfläche. Die Scheiben wurden abwechselnd zur Einbettung in Paraffin und Kunststoff verwendet, wobei immer die aneinandergrenzenden Flächen der beiden Scheiben eine Untersuchungsebene bildeten. Entsprechend konnten Ebenen im Abstand von jeweils 8-10 mm beurteilt werden. Die histopathologische Auswertung erfolgte vorwiegend anhand der Paraffinschnitte. In Einzelfällen wurde zusätzlich der Kunststoffschnitt der entsprechenden Ebene herangezogen, da dieser eine detailgenauere Darstellung ermöglicht.

Aus dem gesamten Block konnten in der Regel 10 Scheiben und damit 5 Untersuchungsebenen hergestellt werden. Abbildung 3 zeigt das Schema der Einteilung in die Untersuchungsebenen.

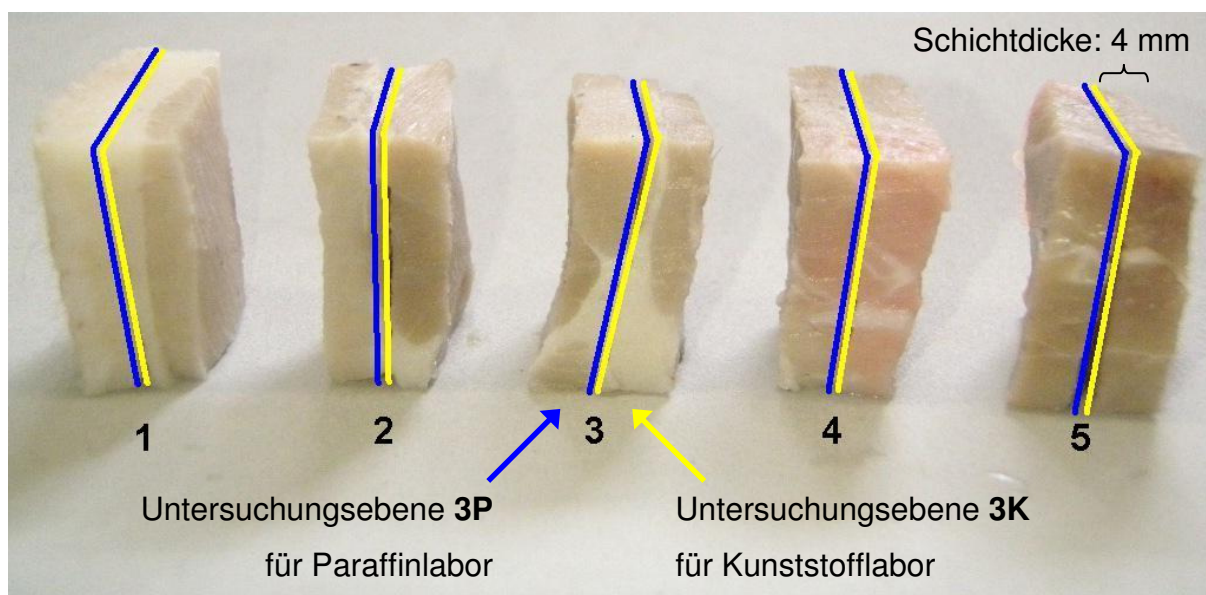


Abbildung 3 – Schematische Darstellung der Untersuchungsebenen 1 bis 5 an der Injektionsstelle für die Einbettung in Paraffin (P) und Kunststoff (K)

Die Scheiben wurden auf Kunststoffkapseln verteilt, sodass 5 Kapseln für die Einbettung in Paraffin weiterverarbeitet wurden und 5 Kapseln für die Einbettung in Kunststoff verwendet werden konnten. Zudem wurde eine Kapsel mit Organproben von Lunge, Leber, Milz, Niere und Herz gefüllt sowie 4 weitere Kapseln mit je einem halbierten Lymphknoten (rechter und linker Nl. cervicalis superficialis dorsalis, rechter und linker Nl. mandibularis).

3.3.2.5 Entwässern und Einbetten

Die Kapseln mit den Proben wurden anschließend über Nacht in 4% Formalinlösung verbracht. Daraufhin wurden die 10 Kapseln mit den Muskelscheiben, Organproben und Lymphknoten in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Das anschließende Einbetten in Paraffinblöcke wurde am *Paraffin Embedding System TBS 88®* von *meditel Medizintechnik* ausgeführt. Von jedem Kapselinhalt wurde je ein Paraffinblock angefertigt. Die verbleibenden 5 Muskelscheiben wurden in Kunststoff eingebettet und in diesem Zustand asserviert.

3.3.2.6 Herstellung der histologischen Schnitte

Von den so hergestellten Paraffinblöcken wurden histologische Schnitte an einem Rotationsmikrotom angefertigt. Der Schneidewinkel betrug 10° und die Einstellung für den Feinschnitt 0,5 µm, was einer tatsächlichen Schnittdicke von 2 – 3 µm entspricht. Die angefertigten Schnitte wurden jeweils einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung und die Gewebeschnitte von der Muskulatur zusätzlich einer Giemsa-Färbung unterzogen. Im Falle der Versuchsgruppe die eine Injektion mit Eisendextran erhalten hatte, wurden die Gewebeschnitte von der Muskulatur und den Lymphknoten zudem zum Sichtbarmachen von zwei- und dreiwertigem Eisen mit einer Turnbull-Färbung angefärbt.

3.3.2.7 Histologische Auswertung

Von jedem Versuchstier wurden die gefärbten, histologischen Schnitte von den Untersuchungsebenen 1 bis 5 der Injektionsstelle histologisch untersucht. Dabei wurde allgemein beurteilt ob keine, eine geringgradige oder mittel- bis hochgradige Entzündung vorlag. Folgender Bewertungsschlüssen wurde angewendet:

- 0 keine Hinweise auf Entzündung
- + geringgradige Entzündung
- ++ mittel- bis hochgradige Entzündung

Bei den entzündlich veränderten Bezirken wurde der Entzündungstyp genauer analysiert. Der Anteil von Neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und Plasmazellen an der gesamten Entzündung wurde nach folgendem Bewertungsschlüssel gewichtet:

- 0 kein Auftreten von Entzündungszellen
- 1 geringer Anteil der Zellart an der gesamten Entzündung
- 2 hoher Anteil der Zellart an der gesamten Entzündung

Zudem wurde das Vorhandensein von Exsudation, Blutungen (extravaskuläre Erythrozyten), Muskelfaserpathologie (Anzeichen von Nekrose oder Myoblasten), Fibrose (Fibroblasten, Fibrozyten und Kollagenfasern) und Hohlraumbildung folgendermaßen eingeteilt:

- 0 nicht vorhanden
- + vorhanden

Die Verteilung von zwei- und dreiwertigem Eisen im Gewebe (Fe^{2+} / Fe^{3+}) wurde bei der mit Eisendextran behandelten Gruppe anhand der nach Turnbull gefärbten Präparate beurteilt. Eisen ist durch seine blaue Färbung im rosarot angefärbten Gewebe gut sichtbar, wobei das Vorkommen von blauer Anfärbung folgendermaßen unterschieden wurde:

- 0 keine Spuren von Fe^{2+} / Fe^{3+}
- + fokale Spuren von Fe^{2+} / Fe^{3+}
- ++ homogene, diffuse Verteilung von Fe^{2+} / Fe^{3+}

Hierbei wurde berücksichtigt, ob es sich um freies Eisen im Gewebe oder um intrazelluläres Eisen handelte. Die Auswertung erfolgte deskriptiv unter Zusammenfassung der erhobenen Befunde.

3.4 Statistik

Die Berechnung der Tierzahlen wurde in einem statistischen Gutachten vom Institut für Statistik der LMU München durchgeführt. Die statistischen Erhebungen erfolgten an der Klinik für Schweine der LMU München. Die SPSS 19.0 software package (*SPSS® Inc., Chicago, IL, USA*) und Excel Software (*Microsoft Office 2009*) wurde für die statistische Analyse und die Diagrammerstellung herangezogen. Von quantitativen Ergebnissen stetig messbarer Parameter (Cortisol, CK, AST, CK/AST) wurden pro Gruppe und Messzeitpunkt der Mittelwert und die Standardabweichungen bestimmt. Da diese Werte sehr stark streuen und eine Normalverteilungsannahme problematisch ist, wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test für den Vergleich der Anstiege vom Basalwert verwendet. Der relevante Effekt war

dann gegeben, wenn die Wahrscheinlichkeit, dass ein Tier der Behandlungsgruppe einen Wert unter dem eines Tieres der Kontrollgruppe aufwies bei mindesten 0,7 lag. Der Gruppenvergleich der Mittelwerte zwischen den unterschiedlichen Injektionsmethoden wurde mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Testverfahren analysiert und auf Signifikanz geprüft. Eine Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus wurde nicht vorgenommen, da die Bestimmung der Gruppen vor der Auswertung der Messergebnisse stattfand.

Der Gruppenvergleich der Mittelwerte zwischen den unterschiedlichen Injektionspräparaten innerhalb der Gruppen eines Injektionsverfahrens wurde mithilfe des Kruskal-Wallis-Testverfahrens vorgenommen. Wenn bei diesem Test eine Signifikanz berechnet wurde, folgte der Vergleich aller Injektionspräparate untereinander mit dem nichtparametrischen Mann-Whitney-Test.

Die Prüfung auf Signifikanz bei den Häufigkeitsverteilungen wurde mithilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt.

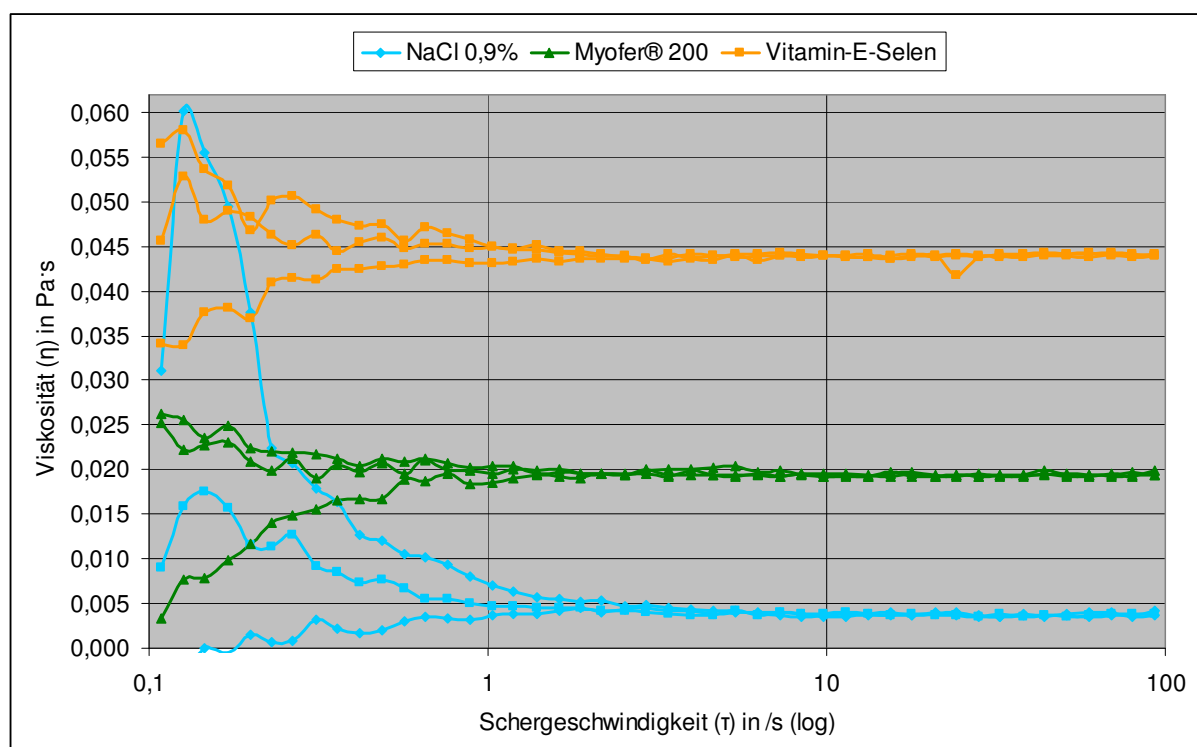
4 Ergebnisse

4.1 Viskositätsmessung

Die Beschleunigungsphase der Geometrie von 0 auf 100/s wurde logarithmiert und in 3 Dekaden eingeteilt (0,1–1 / 1–10 / 10–100). Die momentane Scherspannung (τ) wurde 15-mal pro Dekade gemessen. Daraus entstanden 46 Messungen innerhalb von 1 Minute. Aus den Werten der Scherspannung und Schergeschwindigkeit wurde deren Proportionalitätskonstante ermittelt, die der dynamischen Viskosität (η) in Pa·s entspricht.

Nach einer variablen Beschleunigungsphase mit schwankender Scherspannung, stieg die Scherspannung proportional zur Schergeschwindigkeit an. Dementsprechend erreichte die Viskosität nach dieser Phase einen konstanten Wert. Abbildung 4 zeigt die Fließkurve der dynamischen Viskosität in Abhängigkeit von Schergeschwindigkeit, Zeit und Temperatur.

Abbildung 4 – Fließkurve der gemessenen Viskosität für die Arzneimittel NaCl 0,9%®, Myofer 200® und Vitamin-E-Selen® jeweils nach Dreifachmessung als Funktion der Schergeschwindigkeit, Zeit und Temperatur



Ab einer Schergeschwindigkeit von $\dot{\gamma} = 30/\text{s}$ blieben die Werte für die gemessene Viskosität bei allen Arzneimitteln in etwa konstant, daher wurde das Messintervall auf den Bereich von 30/s bis 100/s festgesetzt. Aus den Werten der Messzeitpunkte die sich in diesem Intervall befanden, wurde jeweils der Mittelwert bestimmt. Für jedes Arzneimittel wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, um aus der mittleren Viskosität der Einzelmessungen den Mittelwert für die Viskosität zu berechnen. Tabelle 5 zeigt die mittlere Viskosität der Arzneimittel.

Tabelle 5 – Viskosität der Injektionspräparate mit Standardabweichung der Werte aller 3 Messvorgänge im Messintervall von 30/s bis 100/s

Injektionspräparat	Viskosität η	Standard-abweichung
Isotonische Kochsalzlösung 0,9%	0,004 Pa·s	0,0003
Myofer [®] 200	0,019 Pa·s	0,0003
Vitamin-E-Selen-Lösung [®]	0,057 Pa·s	0,0003

4.2 Klinische Untersuchung

Von den 248 für die klinische Untersuchung vorgesehenen Tieren wurden 3 vom Versuch ausgeschlossen. Bei zwei Tieren trat als Folge der Injektion von Eisendextran mit Nadel eine anaphylaktoide Reaktion auf, woraufhin von einer weiteren Blutentnahme abgesehen wurde. Bei einem Tier traten bei der Blutentnahme Komplikationen in Form von hochgradiger Dyspnoe auf, und es wurden keine weiteren Blutentnahmen bei diesem Tier vorgenommen.

4.2.1 Lokalreaktion

Die Auswertung der Lokalreaktion erfolgte zunächst für alle Versuchsgruppen gemeinsam. Die Auswertung ergab, dass bei 244 von 248 Tieren eine Lokalreaktion sichtbar war. Die Lokalreaktionen waren rundlich und das Merkmal *Ausmaß in cm* entsprach ihrem Durchmesser. Tabelle 6 zeigt die Anzahl der Tiere, bei denen an der Injektionsstelle generell eine Umfangsvermehrung, Verfärbung, Verhärtung oder Blutung auftrat (positive Tiere). Die restlichen Tiere wiesen die entsprechende

Lokalreaktion nicht auf (nicht aufgeführt). Es wurde die Anzahl der insgesamt positiven Tiere aufgeführt und nach Injektionsmethode und Injektionspräparat aufgegliedert.

Tabelle 6 – Anzahl der Tiere bei denen die Lokalreaktion Umfangsvermehrung, Verfärbung, Verhärtung und Blutung an der Injektionsstelle auftrat, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

	Anzahl der Tiere mit Veränderungen							Signifikanz Nadel - nadellos
	gesamt			Nadel		nadellos		
	positive Tiere	%	n	positive Tiere	n	positive Tiere	n	p
Umfangsvermehrung								
Eisen (3. Lebenstag)	54	(88,5%)	61	27	31	27	30	1,00
Eisen (14. Lebenstag)	48	(78,7%)	61	18	31	30	30	<0,01
NaCl (14. Lebenstag)	32	(51,6%)	62	12	31	20	31	0,04
Vit-E-Se (14. Lebenstag)	47	(77,0%)	61	16	30	31	31	<0,01
gesamt	183	(74,7%)	245	73	123	110	122	<0,01
Verfärbung								
Eisen (3. Lebenstag)	54	(88,5%)	61	24	31	30	30	<0,01
Eisen (14. Lebenstag)	43	(70,5%)	61	13	31	30	30	<0,01
NaCl (14. Lebenstag)	15	(24,2%)	62	5	31	10	31	0,14
Vit-E-Se (14. Lebenstag)	27	(44,3%)	61	7	30	20	31	<0,01
gesamt	139	(56,7%)	245	49	123	90	122	<0,01
Verhärtung								
Eisen (3. Lebenstag)	56	(91,8%)	61	26	31	30	30	0,05
Eisen (14. Lebenstag)	57	(93,4%)	61	27	31	30	30	0,11
NaCl (14. Lebenstag)	55	(88,8%)	62	26	31	29	31	0,42
Vit-E-Se (14. Lebenstag)	55	(90,2%)	61	24	30	31	31	0,01
gesamt	223	(91,0%)	245	103	123	120	122	<0,01
Blutung								
Eisen (3. Lebenstag)	0	(0,0%)	61	0	31	0	30	-
Eisen (14. Lebenstag)	1	(1,6%)	61	1	31	0	30	1,00
NaCl (14. Lebenstag)	31	(50,0%)	62	19	31	12	31	0,08
Vit-E-Se (14. Lebenstag)	40	(65,6%)	61	14	30	26	31	<0,01
gesamt	72	(26,4%)	245	34	123	38	122	0,55

Bei 8 Tieren (3,3%) trat zu keinem Zeitpunkt eine sichtbare Lokalreaktion nach der Injektion auf, wovon 6 Tiere eine Injektion mit Nadel erhalten hatten. Die Lokalreaktionen Umfangsvermehrung, Verhärtung, Verfärbung und Blutungen traten nach der Injektion nicht isoliert auf, sondern in Kombination mit einem oder mehreren der anderen Merkmale.

Bei 74,7% der Tiere konnte eine Umfangsvermehrung an der Injektionsstelle festgestellt werden. Bei 56,7% traten sichtbare Farbveränderungen der Haut auf, darunter Rötungen, bräunliche und blau-graue Verfärbungen oder eine Blässe in der Peripherie der Injektionsstelle. Ein Anteil von 91% der Injektionsstellen war verhärtet wohingegen Blutungen nach 26,4% der Injektionen auftraten.

Umfangsvermehrungen, Verfärbungen und Verhärtungen an der Injektionsstelle traten nach der nadellosen Injektion signifikant häufiger auf als nach der Injektion mit Nadel ($p < 0,01$). Blutungen traten bei beiden Injektionsmethoden gleichermaßen auf.

4.2.1.1 Saugferkel am 3. Lebenstag

Es wurden die Lokalreaktionen Ausdehnung in cm, Umfangsvermehrung, Verfärbung Verhärtung und Blutung beurteilt. Der Score der Umfangsvermehrung, Verfärbung Verhärtung und Blutung umfasst jeweils die Summe aller Punkte, die zu den Bewertungszeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach der Injektion vergeben wurden. Der Score der Ausdehnung beinhaltet nicht die Summe, sondern den Maximalwert, der zu einem der Bewertungszeitpunkte erhoben wurde. Für jedes Merkmal wurde der Mittelwert innerhalb der Versuchsgruppen gebildet.

Der mittlere Score für die Lokalreaktionen Ausdehnung in cm, Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung war nach der nadellosen Injektion signifikant höher als nach der Injektion mit Nadel (Tabelle 7). Der größte Unterschied trat bei der Verfärbung auf. Nach der Injektion mit Nadel wiesen die Tiere der Versuchsgruppe beim Merkmal *Verfärbung* einen mittleren Score von 2,45 auf, während nach der nadellosen Injektion ein mittlerer Score von 7,87 erhoben wurde. Blutungen konnten bei keinem der Tiere festgestellt werden.

Tabelle 7 – Mittlerer Score der Lokalreaktionen bei Saugferkeln am 3. Lebenstag als Summe der Scores 4 h, 24 h und 7 d nach der Injektion von Eisen-dextran, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

Merkmal	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
Verfärbung	Nadel	31	2,45	2,16	0	8	<0,01
	nadellos	30	7,87	2,08	2	11	
Ausdehnung in cm	Nadel	31	1,31	0,84	0	3	<0,01
	nadellos	30	2,95	1,08	1	6	
Umfangsvermehrung	Nadel	31	2,58	1,75	0	6	0,02
	nadellos	30	4,10	1,75	0	7	
Verhärtung	Nadel	31	2,39	2,06	0	8	<0,01
	nadellos	30	4,33	1,54	2	7	
Blutung	Nadel	0	0,00	0,00	0	0	-
	nadellos	0	0,00	0,00	0	0	

Zudem wurde von allen Tieren aus den einzelnen Scores der Merkmale Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung die maximale Ausprägung zu den Bewertungszeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach der Injektion ermittelt. Die Auswertung ergab folgende Häufigkeitsverteilung (Tabelle 8 und Tabelle 9):

Tabelle 8 – Maximale Ausdehnung der Lokalreaktion an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanz des Unterschiedes zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode

Maximale Ausdehnung in cm					
	Nadel		nadellos		p
	Tiere	%	Tiere	%	
keine Veränderung	4	12,9	0	0,0	<0,01
0,5 - 1 cm	11	35,5	1	3,3	
1,5 - 2 cm	14	45,2	8	26,6	
2,5 - 3 cm	2	6,5	15	50,0	
> 3 cm	0	0,0	6	20,0	

Der Unterschied bei der Häufigkeitsverteilung der maximalen Ausdehnung der Lokalreaktion zwischen der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel war signifikant ($p < 0,01$). Der Durchmesser der Lokalreaktion betrug bei 70% der nadellos

behandelten Tiere mehr als 2,5 cm, während die Lokalreaktion bei 93,5% der mit Nadel behandelten Tiere einen Durchmesser von 2 cm oder weniger hatte.

Tabelle 9 – Maximale Ausprägung der Merkmale Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode

	Umfangsvermehrung				Verfärbung				Verhärtung			
	Nadel		nadellos		Nadel		nadellos		Nadel		nadellos	
	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%
keine Veränderung	4	12,9	1	3,3	7	22,6	0	0,0	5	16,1	0	0,0
andeutungsweise	8	25,8	1	3,3	7	22,6	0	0,0	13	41,9	3	10,0
geringgradig	11	35,5	6	20,0	12	38,7	1	3,3	8	25,8	5	16,7
mittelgradig	7	22,6	12	40,0	5	16,1	7	23,3	5	16,1	13	43,3
hochgradig	1	3,2	10	33,3	0	0,0	22	73,3	0	0,0	9	30,0
p<0,01					p<0,01				p<0,01			

Die Unterschiede bei der Häufigkeitsverteilung der maximalen Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung an der Lokalreaktion zwischen der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel war signifikant ($p<0,01$). Hochgradige Verfärbungen und Verhärtungen der Injektionsstelle traten ausschließlich nach der nadellosen Injektion auf. Hoch- und mittelgradige Verhärtungen traten bei 73,3% der Tiere nach der nadellosen Injektion auf und bei 16,1% der Tiere nach der Injektion mit Nadel. Hoch- und mittelgradige Verfärbungen traten bei 96,6% der Tiere nach der nadellosen Injektion und bei 16,1% der Tiere nach der Injektion mit Nadel auf. Kein Tier blieb nach der nadellosen Injektion ohne Verhärtung und Verfärbung an der Injektionsstelle. Hoch- und mittelgradige Umfangsvermehrungen traten nach der nadellosen Injektion häufiger auf (73,3%) als nach der Injektion mit Nadel (25,8%).

4.2.1.2 Saugferkel am 14. Lebenstag

Es wurden die Lokalreaktionen Ausdehnung in cm, Umfangsvermehrung, Verfärbung Verhärtung und Blutung beurteilt. Der Score der Umfangsvermehrung, Verfärbung Verhärtung und Blutung jedes Versuchstieres umfasst jeweils die Summe der Bewertungspunkte, die 4 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion vergeben wurden. Ein Bewertungszeitpunkt von 7 Tagen entfiel, da zu diesem Zeitpunkt die

Lokalreaktion nicht mehr zu beurteilen war. Der Score der Ausdehnung beinhaltet nicht die Summe, sondern den Maximalwert, der zu einem der beiden Bewertungszeitpunkte erhoben wurde. Für jedes Merkmal wurde der Mittelwert des Scores innerhalb der Versuchsgruppen gebildet.

Bei den Tieren dieser Altersgruppe war dieser mittlere Score unabhängig vom Injektionspräparat nach der nadellosen Injektion bei den Merkmalen Ausdehnung, Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung höher als nach der Injektion per Nadel. Blutungen konnten nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung und Vitamin-E-Selen festgestellt werden, nicht jedoch nach der Injektion von Eisendextran. Nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung mit der Nadel traten häufiger Blutungen auf als nach der nadellosen Injektion.

Bei 28 von 61 Tieren war nach der Injektion von Eisendextran ein vermehrtes Zurückfließen des Eisenpräparates aus der Injektionsstelle auffällig. Von diesen 28 Tieren hatten 8 eine Injektion per Nadel und 20 Tiere eine nadellose Injektion erhalten.

Eine Übersicht der Mittelwerte des Scores, der pro Tier aus der Summe der Bewertungspunkte gebildet wurde, die 4 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion erhoben wurden, ist in Tabelle 10 und Abbildung 5 zu sehen.

Tabelle 10 – Mittlerer Score der Lokalreaktionen bei Saugferkeln am 14. Lebenstag als Summe der Scores 4 h und 24 h nach der Injektion, mit Signifikanz der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

Merkmal	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
Ausdehnung in cm	Nadel (NaCl)	31	0,44	0,33	0	1	<0,01
	nadellos (NaCl)	31	1,03	0,96	0	4	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	1,07	1,25	0	4	<0,01
	nadellos (Vit-E-Se)	31	2,60	1,21	1	5	
	Nadel (Eisen)	31	1,13	1,34	0	4	<0,01
	nadellos (Eisen)	30	2,58	0,97	1	6	
Umfangs- vermehrung	Nadel (NaCl)	31	0,71	1,07	0	3	0,02
	nadellos (NaCl)	31	1,68	1,74	0	6	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	1,13	1,48	0	6	<0,01
	nadellos (Vit-E-Se)	31	4,19	1,76	1	7	
	Nadel (Eisen)	31	1,26	1,46	0	5	<0,01
	nadellos (Eisen)	30	3,17	1,09	1	5	
Verfärbung	Nadel (NaCl)	31	0,52	1,26	0	4	0,23
	nadellos (NaCl)	31	0,71	1,32	0	6	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	0,30	0,60	0	2	<0,01
	nadellos (Vit-E-Se)	31	1,65	1,70	0	6	
	Nadel (Eisen)	31	0,94	1,63	0	8	<0,01
	nadellos (Eisen)	30	5,30	1,34	2	7	
Verhärtung	Nadel (NaCl)	31	2,48	1,31	0	4	0,24
	nadellos (NaCl)	31	3,71	3,55	0	20	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	2,57	1,77	0	6	<0,01
	nadellos (Vit-E-Se)	31	5,81	1,72	2	8	
	Nadel (Eisen)	31	2,00	1,39	0	5	<0,01
	nadellos (Eisen)	30	4,57	1,14	3	6	
Blutung	Nadel (NaCl)	31	1,61	1,45	0	4	0,07
	nadellos (NaCl)	31	0,97	1,30	0	4	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	1,03	1,22	0	3	<0,01
	nadellos (Vit-E-Se)	31	2,39	1,20	0	4	
	Nadel (Eisen)	31	0,03	0,18	0	1	-
	nadellos (Eisen)	30	-	-	0	0	

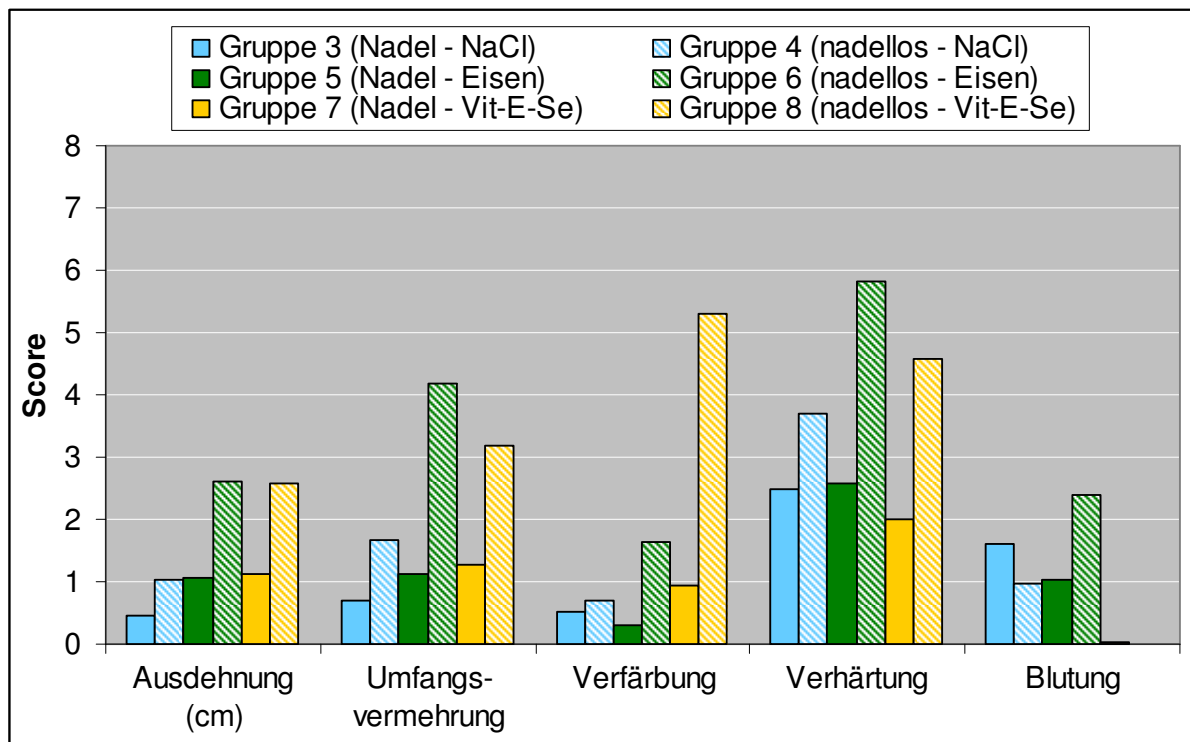


Abbildung 5 – Mittlerer Score der Lokalreaktionen bei Saugferkeln am 14. Lebenstag als Summe der Scores 4 h und 24 h nach der Injektion, aufgeteilt nach Injektionspräparat und Injektionsmethode

Zusätzlich wurde von allen Tieren aus den einzelnen Scores der Merkmale Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung und Blutung die maximale Ausprägung zu den Bewertungszeitpunkten 4 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion ermittelt. Die Auswertung ergab folgende Häufigkeitsverteilung (Tabelle 11 bis Tabelle 15):

Tabelle 11 – Maximale Ausdehnung der Lokalreaktion an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode

Maximale Ausdehnung in cm												
	Gruppe 3 Nadel NaCl n = 31		Gruppe 4 nadellos NaCl n = 31		Gruppe 5 Nadel Vit-E-Se n = 30		Gruppe 6 nadellos Vit-E-Se n = 31		Gruppe 7 Nadel Eisen n = 31		Gruppe 8 nadellos Eisen n = 30	
	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%
keine Veränderung	7	22,6	3	9,7	7	23,3	0	0,0	6	19,4	0	0,0
0,5 - 1 cm	2	6,5	22	71,0	15	50,0	4	12,9	17	54,8	1	3,3
1,5 - 2 cm	22	71,0	2	6,5	2	6,7	14	45,2	2	6,5	12	40,0
2,5 - 3 cm	0	0,0	3	9,7	4	13,3	5	16,1	2	6,5	15	50,0
> 3 cm	0	0,0	1	3,2	2	6,7	8	25,8	4	12,9	2	6,7
p<0,01					p<0,01				p<0,01			

Der Unterschied bei der Häufigkeitsverteilung der maximalen Ausdehnung der Lokalreaktion zwischen der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel war unabhängig vom Injektionspräparat signifikant ($p<0,01$).

Nach der Injektion von Vitamin-E-Selen wurden häufiger Lokalreaktionen mit einem Durchmesser von mehr als 3 cm beobachtet als nach der Injektion von Eisendextran. Nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung trat keine Lokalreaktion mit einem Durchmesser von mehr als 2 cm auf. Der Anteil der Tiere, deren Lokalreaktion einen Durchmesser von mehr als 2 cm hatte, war bei allen Injektionspräparaten nach der nadellosen Injektion höher als nach der Injektion mit Nadel. So traten nach der nadellosen Injektion Lokalreaktionen von über 2 cm im Durchmesser bei 12,9% der Tiere nach Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, bei 41,9% der Tiere nach der Injektion von Vitamin-E-Selen und bei 56,7% der Tiere nach der Injektion von Eisendextran. Bei der Injektion mit Nadel traten bei keinem der Tiere Lokalreaktionen von über 2 cm im Durchmesser nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung auf. Bei der Injektion von Vitamin-E-Selen mit Nadel waren es 20,1% und bei der Injektion von Eisendextran 9,4%.

Tabelle 12 – Maximale Ausprägung von Schwellungen an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode

Umfangsvermehrung												
	Gruppe 3 Nadel NaCl n = 31		Gruppe 4 nadellos NaCl n = 31		Gruppe 5 Nadel Vit-E-Se n = 30		Gruppe 6 nadellos Vit-E-Se n = 31		Gruppe 7 Nadel Eisen n = 31		Gruppe 8 nadellos Eisen n = 30	
	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%
keine Veränderung	19	61,3	11	35,5	14	46,7	0	0,0	13	41,9	0	0,0
andeutungsweise	6	19,4	5	16,1	7	23,3	4	12,9	6	19,4	2	6,7
geringgradig	3	9,7	8	25,8	6	20,0	8	25,8	9	29,0	19	63,3
mittelgradig	3	9,7	7	22,6	2	6,7	7	22,6	3	9,7	9	30,0
hochgradig	0	0,0	0	0,0	1	3,3	12	38,7	0	0,0	0	0,0
p = 0,11					p<0,01				p<0,01			

Die Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden bei der Häufigkeitsverteilung der maximalen Umfangsvermehrung an der Injektionsstelle waren nach der Injektion von Vitamin-E-Selen und Eisendextran signifikant ($p<0,01$). Die Häufigkeitsverteilung der maximalen Umfangsvermehrung nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung unterschied sich nicht signifikant zwischen den Injektionsmethoden ($p = 0,11$).

Hochgradige Umfangsvermehrungen traten nach der Injektion von Vitamin-E-Selen-Lösung auf, nicht jedoch nach der Injektion von Eisendextran oder isotonischer Kochsalzlösung. Davon war 1 von 30 Tieren in der mit Nadel behandelten Versuchsgruppe betroffen, während es bei den Tieren der Versuchsgruppe, die eine nadellose Injektion erhielt 12 von 31 Tieren waren. In der letztgenannten Gruppe kam kein Tier ohne Schwellung nach der Injektion vor. Dies gilt auch für die nadellose Injektion von Eisendextran. Hier trat bei mehr als der Hälfte der Tiere (63,3%) eine geringgradige Schwellung der Injektionsstelle auf. Hingegen machte bei der Gruppe 4, die eine nadellose Injektion mit isotonischer Kochsalzlösung erhalten hatten und allen Gruppen die eine Injektion per Nadel erhalten hatten, die Anzahl der Tiere ohne jegliche Anzeichen einer Schwellung den größten Anteil aus.

Tabelle 13 – Maximale Ausprägung von Verfärbungen der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode

	Verfärbung											
	Gruppe 3 Nadel NaCl n = 31		Gruppe 4 nadellos NaCl n = 31		Gruppe 5 Nadel Vit-E-Se n = 30		Gruppe 6 nadellos Vit-E-Se n = 31		Gruppe 7 Nadel Eisen n = 31		Gruppe 8 nadellos Eisen n = 30	
	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%
keine Veränderung	26	83,9	21	67,7	23	76,7	11	35,5	18	58,1	0	0,0
andeutungsweise	0	0,0	3	9,7	5	16,7	5	16,1	6	19,4	1	3,3
geringgradig	2	6,5	6	19,4	2	6,7	9	29,0	5	16,1	4	13,3
mittelgradig	1	3,2	0	0,0	0	0,0	6	19,4	1	3,2	14	46,7
hochgradig	2	6,5	1	3,2	0	0,0	0	0,0	1	3,2	11	36,7
p = 0,14					p<0,01				p<0,01			

Die Unterschiede bei der Häufigkeitsverteilung der maximalen Verfärbung der Lokalreaktion nach der Injektion von Vitamin-E-Selen und Eisendextran zwischen den Injektionsmethoden waren signifikant ($p<0,01$). Die Häufigkeitsverteilung der maximalen Umfangsvermehrung nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung unterschied sich nicht signifikant zwischen den Injektionsmethoden ($p = 0,14$).

Die Häufigkeit und der Ausprägungsgrad von hochgradigen Verfärbungen der Injektionsstelle waren nach der Injektion von Eisendextran am höchsten. Der höchste Anteil von Tieren mit mittel- bis hochgradigen Verfärbungen an der Injektionsstelle trat nach der nadellosen Injektion von Eisendextran auf und belief sich auf 83,4%. Keines der Tiere aus dieser Gruppe blieb ohne Verfärbung an der Injektionsstelle. Die Injektionsstellen waren gerötet bis rötlich-braun verfärbt. In der Gruppe, die Eisendextran hingegen per Nadel erhalten hatte, blieben über die Hälfte (58,1%) der Tiere ohne jegliche Verfärbungen der Injektionsstelle und bei 2 Tieren (6,4%) kamen mittel- bis hochgradige Verfärbungen vor.

Die Verfärbungen waren nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung und Vitamin-E-Selen geringer ausgeprägt als nach der Injektion von Eisendextran, reichten aber von gerötet über bläulich-grau bis hin zu blass.

Nach der Applikation von Vitamin-E-Selen-Lösung traten in keinem Fall hochgradige Verfärbungen an der Injektionsstelle auf. Die stärkste Ausprägung der Verfärbung war eine mittelgradige bei 19,4% der Tiere, die ausnahmslos nach der nadellosen

Injektion beobachtet wurden. Bei den restlichen Tieren dieser Versuchsgruppen (53 von 62 Tieren) traten geringgradige, andeutungsweise oder gar keine Verfärbungen an der Injektionsstelle auf. Keine Verfärbung konnte bei 35,5% der Tiere nach der nadellosen Injektion und bei 76,7% der Tiere nach der Injektion mit Nadel festgestellt werden.

Bei der Applikation von isotonischer Kochsalzlösung traten ebenfalls nach der Injektion per Nadel weniger ausgeprägte Verfärbungen auf als nach der nadellosen Injektion. Der Anteil von Tieren, bei denen keine Veränderung auftrat, überwog mit 67,7% nach der nadellosen Injektion und 83,9% bei der Injektion per Nadel.

Tabelle 14 – Maximale Ausprägung von Verhärtungen an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode

Verhärtung												
	Gruppe 3 Nadel NaCl n = 31		Gruppe 4 nadellos NaCl n = 31		Gruppe 5 Nadel Vit-E-Se n = 30		Gruppe 6 nadellos Vit-E-Se n = 31		Gruppe 7 Nadel Eisen n = 31		Gruppe 8 nadellos Eisen n = 30	
	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%
keine Veränderung	4	12,9	2	6,5	6	20,0	0	0,0	4	12,9	0	0,0
andeutungsweise	2	6,5	4	12,9	4	13,3	1	3,2	12	38,7	0	0,0
geringgradig	21	67,7	10	32,3	12	40,0	0	0,0	11	35,5	10	33,3
mittelgradig	4	12,9	10	32,3	6	20,0	18	58,1	4	12,9	17	56,7
hochgradig	0	0,0	5	16,1	2	6,7	12	38,7	0	0,0	3	10,0
p = 0,012					p<0,01				p<0,01			

Die Unterschiede bei der Häufigkeitsverteilung der maximalen Verhärtung der Lokalreaktion nach der Injektion von Vitamin-E-Selen und Eisendextran zwischen den Injektionsmethoden waren signifikant ($p<0,01$). Die Häufigkeitsverteilung der maximalen Umfangsvermehrung nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung unterschied sich nicht signifikant zwischen den Injektionsmethoden ($p = 0,012$).

In allen Gruppen traten Veränderungen der Konsistenz an der Injektionsstelle in Form von Verhärtung des Gewebes auf. Der Anteil der Tiere, die von mittel- bis hochgradigen Verhärtungen an der Injektionsstelle betroffen waren, war in den Gruppen, die eine nadellose Injektion erhalten hatten, höher als in den Vergleichsgruppen, die eine Injektion per Nadel erhalten hatten. Nach der Injektion von Vitamin-E-Selen war der Anteil der Tiere mit mittel- bis hochgradigen Verhärtungen

an der Injektionsstelle höher als bei den anderen Injektionspräparaten. Nach der Injektion von Vitamin-E-Selen per Nadel traten bei 26,7% der Tiere mittel- bis hochgradige Verhärtungen der Injektionsstelle auf und nach der nadellosen Injektion von Vitamin-E-Selen bei 96,8% der Tiere. Auch nach der nadellosen Injektion von Eisendextran war der Anteil an mittel- bis hochgradigen Verhärtungen der Injektionsstellen mit 66,7% höher als in der Vergleichsgruppe nach einer Injektion mit Nadel (12,9%), aber der Anteil war geringer als nach der Injektion von Vitamin-E-Selen. Der Anteil der Tiere mit mittel- bis hochgradigen Veränderungen an der Injektionsstelle war nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung geringer als nach der Injektion von Eisendextran oder Vitamin-E-Selen. Doch auch hier war der Anteil der Tiere mit mittel- bis hochgradigen Verhärtungen an der Injektionsstelle nach der nadellosen Injektion mit 48,4% höher als nach der Injektion mit Nadel (12,9%).

Tabelle 15 – Auftreten von Blutungen an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode

Blutung												
keine Veränderung andeutungsweise geringgradig mittelgradig hochgradig	Gruppe 3 Nadel NaCl n = 31		Gruppe 4 nadellos NaCl n = 31		Gruppe 5 Nadel Vit-E-Se n = 30		Gruppe 6 nadellos Vit-E-Se n = 31		Gruppe 7 Nadel Eisendex. n = 31		Gruppe 8 nadellos Eisendex. n = 30	
	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%	Tiere	%
	12	38,7	19	61,3	16	53,3	5	16,1	30	96,8	30	100,0
	1	3,2	0	0,0	2	6,7	0	0,0	1	3,2	0	0,0
	7	22,6	7	22,6	7	23,3	7	22,6	0	0,0	0	0,0
	8	25,8	4	12,9	5	16,7	16	51,6	0	0,0	0	0,0
	3	9,7	1	3,2	0	0,0	3	9,7	0	0,0	0	0,0
p = 0,30					p<0,01				p = 1,00			

Blutungen unmittelbar nach der Injektion konnten ausschließlich bei den Tieren der Gruppe festgestellt werden, die isotonische Kochsalzlösung oder Vitamin-E-Selen erhalten hatten. Nur nach der nadellosen Injektion von Eisendextran fiel bei einem Einzeltier eine geringgradige Blutung auf.

Der Unterschied zwischen den Injektionsmethoden hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung des Auftretens von Blutungen war nach der Injektion von Vitamin-E-Selen signifikant ($p<0,01$). Bei der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung traten keine signifikanten Unterschiede auf ($p = 0,30$).

Nach der nadellosen Injektion von Vitamin-E-Selen traten bei mehr als der Hälfte (83,9%) der Tiere Blutungen auf während es nach der Injektion von Vitamin-E-Selen mit Nadel etwas weniger als die Hälfte waren (46,7%). Der Anteil der Blutungen mit mittel- oder hochgradiger Ausprägung war ebenfalls nach der nadellosen Injektion höher (61,3%) als nach der Injektion mit Nadel (16,7%).

Dagegen traten bei der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung Blutungen häufiger nach der Injektion mit Nadel auf (61,3%) als nach der nadellosen Injektion (38,7%). Auch das Auftreten von mittel- bis hochgradigen Blutungen wurde nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung mit Nadel häufiger beobachtet (35,5%) als nach der nadellosen Injektion (16,1%).

4.2.2 Cortisol

Der Verlauf der mittleren Cortisolkonzentration war bei allen Gruppen charakterisiert durch einen maximalen Anstieg 30 Minuten nach der Injektion. Die Werte nahmen 4 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion wieder ab.

4.2.2.1 Saugferkel am 3. Lebenstag

Die mittleren Serumkonzentrationen, Standardabweichungen und Minimal- sowie Maximalkonzentrationen der Cortisolmessungen der Saugferkel am 3. Lebenstag sind nach Gruppen aufgeteilt in Tabelle 16 dargestellt.

Tabelle 16 – Mittlere Cortisolkonzentrationen in nmol/l vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

t	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
basal	Nadel	31	37,9	18,5	9,9	84,98	0,019
	nadellos	30	48,7	19,8	17,3	104,1	
30 Minuten	Nadel	31	76,2	43,4	27,4	238,1	0,000
	nadellos	30	154,9	94,2	30,0	401,1	
1 Stunde	Nadel	31	76,1	56,1	26,7	256,6	0,001
	nadellos	30	133,3	84,8	32,9	363,2	
4 Stunden	Nadel	31	51,6	33,1	10,4	151,8	0,042
	nadellos	30	72,5	46,0	10,6	235,8	
24 Stunden	Nadel	31	38,6	19,2	10,5	80,9	0,341
	nadellos	30	36,5	22,4	10,8	106,2	

Die mittlere Basalkonzentration vor der Injektion lag bei den Saugferkeln am 3. Lebenstag zwischen 37,9 nmol/l (Injektion per Nadel) und 48,7 nmol/l (nadellose Injektion). Die Differenz der Werte zwischen den Gruppen war nicht signifikant.

Bei Saugferkeln im Alter von 3 Lebenstagen wurde 30 Minuten nach der Injektion die maximale mittlere Cortisolkonzentration gemessen. Der Anstieg der mittleren Cortisolkonzentration 30 Minuten nach der Injektion im Vergleich zum Basalwert war bei den Tieren beider Gruppen signifikant ($p < 0,01$). So stieg die Cortisolkonzentration nach der nadellosen Injektion von 48,7 auf 157,9 nmol/l und nach der Injektion mit Nadel von 37,9 auf 76,2 nmol/l an. Die maximale mittlere Cortisolkonzentration war bei den Tieren der Gruppe, die eine nadellose Injektion erhalten hatten signifikant höher ($p < 0,01$) als bei den Tieren, die eine Injektion mit Nadel erhalten hatten (154,9 nmol/l bzw. 76,2 nmol/l). 1 Stunde nach der Injektion stagnierte der mittlere Wert der Tiere, die eine Injektion mit Nadel erhalten hatten bei 76,1 nmol/l und fiel bei den Tieren, die eine nadellose Injektion erhalten hatten auf 133,3 nmol/l ab. Der Unterschied der mittleren Cortisolkonzentrationen von 57,2 nmol/l zwischen den Gruppen 1 Stunde nach der Injektion war signifikant ($p > 0,01$).

Die mittleren Cortisolkonzentrationen sanken 4 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion auf 72,5 und 36,5 nmol/l (nadellose Injektion) bzw. 51,6 und 38,6 nmol/l (Injektion mit Nadel) ab. Der Unterschied zwischen den Gruppen war zu diesen Zeitpunkten nicht mehr signifikant. Auch unterschieden sich die Werte im Vergleich zum Basalwert nicht signifikant. Die mittleren Cortisolkonzentrationen beider Gruppen sind nach Interpolation der Messwerte als Verlaufskurve in Abbildung 6 dargestellt.

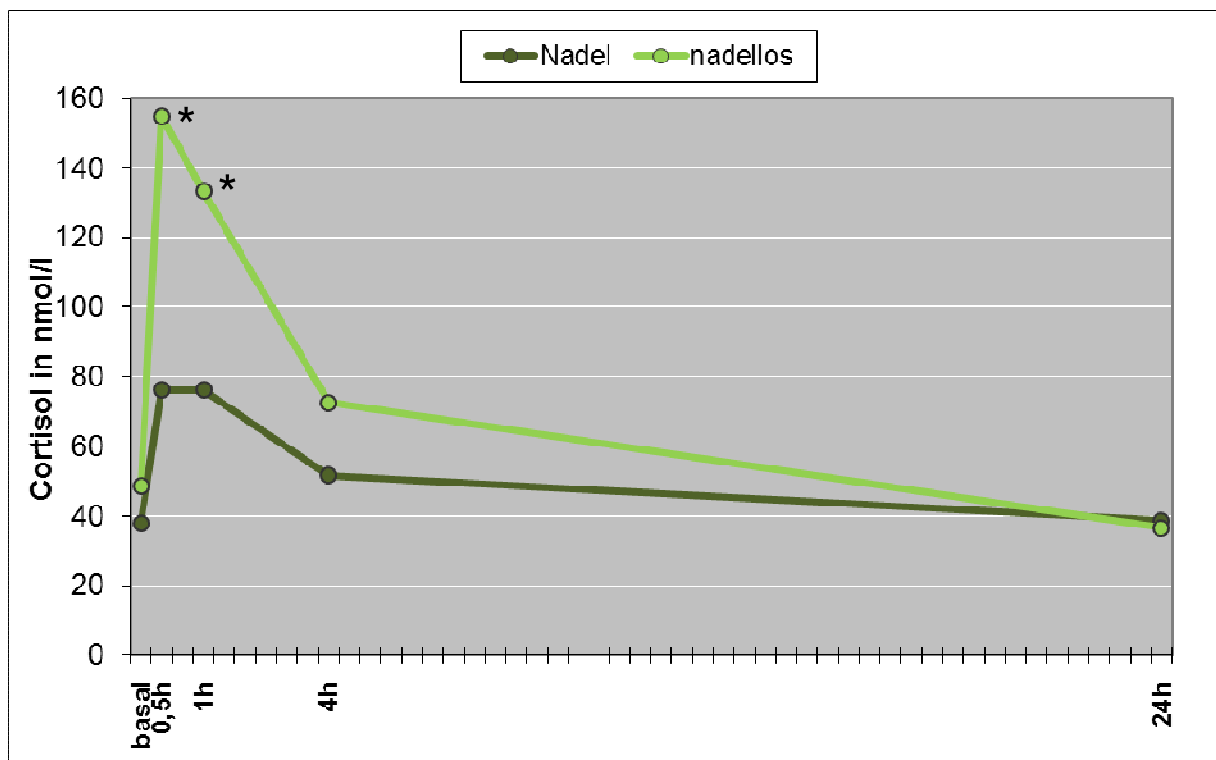


Abbildung 6 – Verlauf der mittleren Cortisolkonzentration bei Saugferkeln am 3. Lebenstag nach der Injektion von Eisendextran durch Interpolation der mittleren Cortisolkonzentration vor der Injektion und 30 min, 4 h und 24 h nach der Injektion (* $p \leq 0,001$)

4.2.2.2 Saugferkel am 14. Lebenstag

Die mittleren Serumkonzentrationen, Standardabweichungen und Minimal- sowie Maximalkonzentrationen der Cortisolmessung der Saugferkel am 14. Lebenstag sind nach Gruppen aufgeteilt in Tabelle 17 zusammengefasst.

Tabelle 17 – Mittlere Cortisolkonzentrationen in nmol/l vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

t	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
basal	Nadel (NaCl)	31	31,3	27,4	3,5	156,3	0,56
	nadellos (NaCl)	31	25,5	13,8	6,3	53,36	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	29,3	14,4	8,5	59,7	0,02
	nadellos (Vit-E-Se)	31	24,6	26,6	2,9	131,6	
	Nadel (Eisen)	31	29,8	15,9	6,4	61,6	0,26
	nadellos (Eisen)	30	36,3	20,9	6,4	79,18	
30 Minuten	Nadel (NaCl)	31	49,7	50,0	7,6	269,7	0,40
	nadellos (NaCl)	31	38,3	28,7	8,5	129,7	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	43,1	28,7	6,4	151,4	0,37
	nadellos (Vit-E-Se)	31	52,4	61,1	8,8	266,4	
	Nadel (Eisen)	31	49,5	28,3	8,9	142,2	0,17
	nadellos (Eisen)	30	71,4	54,0	15,1	217,9	
1Stunde	Nadel (NaCl)	31	67,6	82,1	6,4	472,2	0,17
	nadellos (NaCl)	31	43,2	25,5	6,7	118,4	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	70,1	50,5	9,9	206,1	0,54
	nadellos (Vit-E-Se)	31	74,1	82,2	10,4	390,4	
	Nadel (Eisen)	31	57,1	41,2	13,3	192,7	0,16
	nadellos (Eisen)	30	73,7	51,1	15,0	252,1	
4 Stunden	Nadel (NaCl)	31	27,3	21,2	4,8	78,9	0,09
	nadellos (NaCl)	31	34,2	22,5	8,2	95,27	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	20,7	15,6	3,5	56,1	0,38
	nadellos (Vit-E-Se)	31	20,2	24,1	1,3	129,7	
	Nadel (Eisen)	31	37,4	21,5	6,1	90,6	0,49
	nadellos (Eisen)	30	43,7	26,6	15,2	118,8	
24 Stunden	Nadel (NaCl)	31	26,4	18,1	2,5	76,0	0,49
	nadellos (NaCl)	31	28,5	17,8	4,5	79,19	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	28,1	12,9	7,3	63,6	0,12
	nadellos (Vit-E-Se)	31	30,0	41,8	2,2	236,9	
	Nadel (Eisen)	31	18,9	12,8	4,9	54,2	0,47
	nadellos (Eisen)	30	23,1	18,2	4,2	68,52	

Die mittleren Basalwerte der Cortisolkonzentration vor der Injektion lagen bei den Saugferkeln am 14. Lebenstag im Bereich zwischen 24,6 nmol/l und 36,3 nmol/l und unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

Die mittleren Cortisolkonzentrationen der Vergleichsgruppen (nadellose Injektion bzw. Injektion mit Nadel) nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, Eisendextran oder Vitamin-E-Selen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Auch beim Vergleich aller 6 Gruppen traten zu keinem Zeitpunkt nach der Injektion signifikante Unterschiede auf. Die mittleren Cortisolkonzentrationen aller Gruppen sind nach Interpolation der Messwerte als Verlaufskurve auf Abbildung 7 dargestellt.

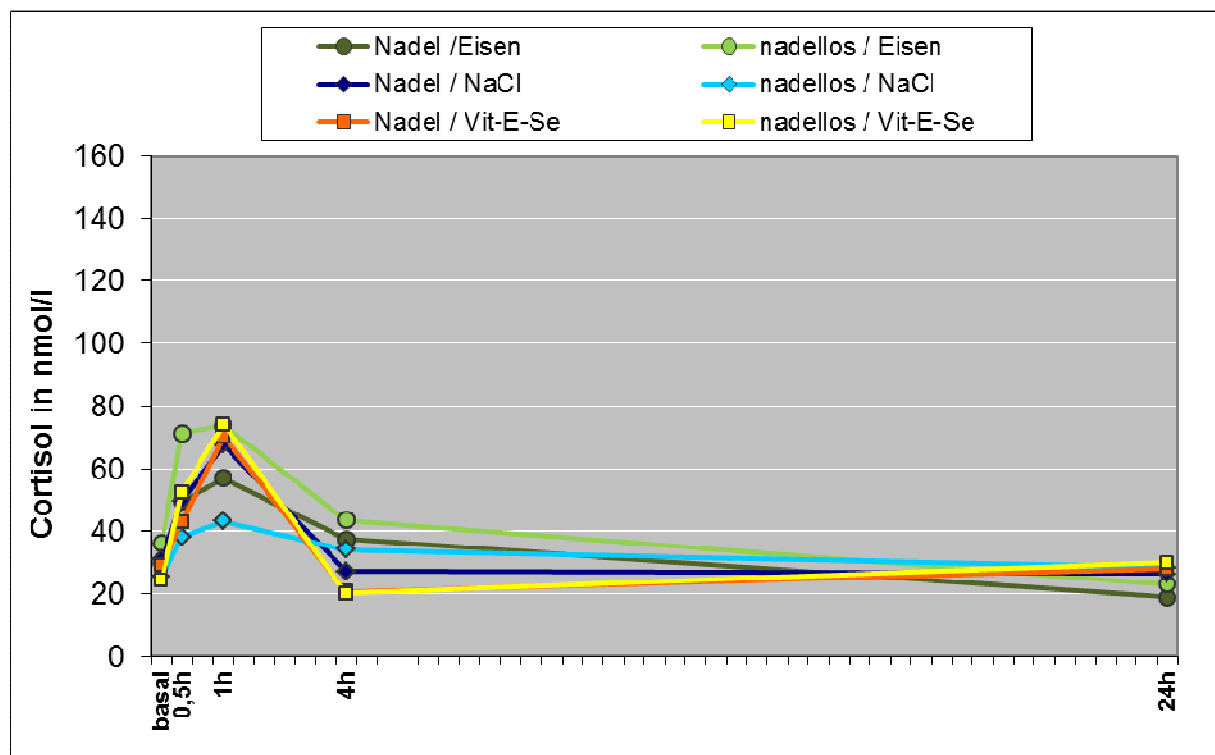


Abbildung 7 – Verlauf der mittleren Cortisolkonzentration bei Saugferkeln am 14. Lebenstag nach der Injektion von Eisendextran durch Interpolation der mittleren Cortisolkonzentration vor der Injektion und 30 min, 4 h und 24 h nach der Injektion

Der maximale Anstieg der mittleren Cortisolkonzentration im Vergleich zum Basalwert wurde bei allen Gruppen 1 Stunde nach der Injektion gemessen. Tabelle 18 zeigt die p-Werte der Anstiege der mittleren Cortisolkonzentration zu den verschiedenen Messzeitpunkten im Vergleich zum Basalwert innerhalb der Versuchsgruppen. 30 Minuten nach der Injektion trat ein signifikanter Anstieg im

Vergleich zum Basalwert bei der nadellosen Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, Vitamin-E-Selen und Eisendextran sowie bei der Injektion von Eisendextran mit Nadel auf. 1 Stunde nach der Injektion war der Anstieg der Werte im Vergleich zur Basalkonzentration bei beiden Injektionsmethoden und allen Injektionspräparaten signifikant. 4 Stunden und 24 Stunden nach der Injektion sanken die mittleren Cortisolkonzentrationen aller Gruppen und wichen nicht signifikant vom Basalwert ab, mit Ausnahme der Gruppe 5 (Vitamin-E-Selen per Nadel), bei der die mittlere Cortisolkonzentration 4 Stunden nach der Injektion signifikant geringer war als der Basalwert (20,7 und 29,3 nmol/l), und der Gruppe 6 (Eisendextran per Nadel), bei der die mittlere Cortisolkonzentration 24 Stunden nach der Injektion signifikant geringer war als der Basalwert (18,9 und 29,8 nmol/l).

Tabelle 18 – Asymptotische Signifikanz (p-Werte) der Unterschiede der mittleren Cortisolkonzentrationen 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion im Vergleich zum Basalwert innerhalb der Versuchsgruppen

Gruppe	Asymptotische Signifikanz (2-seitig)			
	30 min - basal	1 h - basal	4 h - basal	24 h - basal
Nadel (NaCl)	0,021	0,000	0,493	0,112
nadellos (NaCl)	0,011	0,001	0,096	0,445
Nadel (Vit-E-Se)	0,012	0,000	0,009	0,766
nadellos (Vit-E-Se)	0,000	0,000	0,337	0,256
Nadel (Eisen)	0,000	0,001	0,063	0,001
nadellos (Eisen)	0,000	0,000	0,289	0,015

4.2.3 CK und AST

Abbildung 8 zeigt den Verlauf der CK-Konzentration im Serum von Saugferkeln aller Versuchsgruppen vor und nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, Vitamin-E-Selen und Eisendextran. Bei allen Gruppen wurde der Maximalwert der Serum-CK-Konzentration 4 Stunden nach der Injektion gemessen.

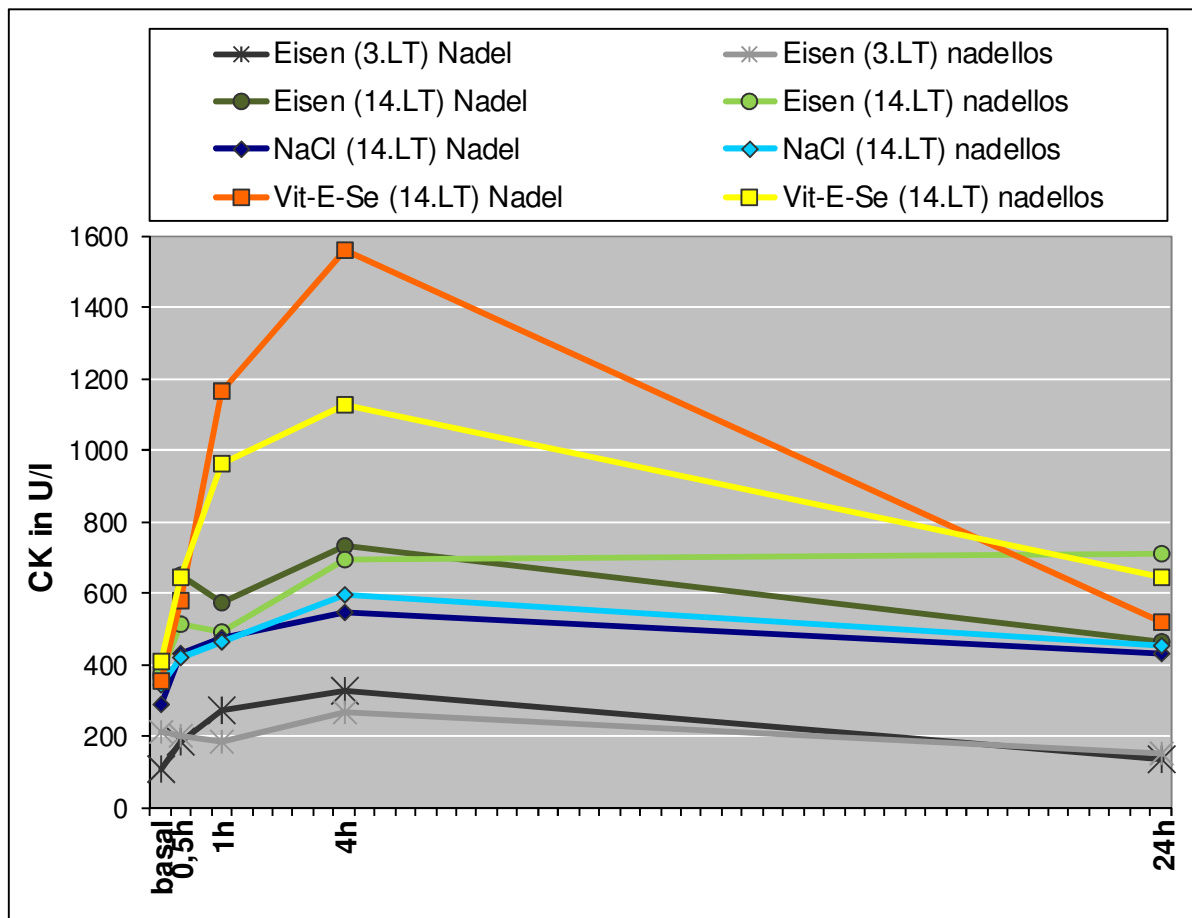


Abbildung 8 – Verlauf der mittleren CK-Konzentration im Serum von Saugferkeln nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, Vitamin-E-Selen und Eisendextran durch Interpolation der mittleren CK-Konzentration vor sowie 30 min, 4 h und 24 h nach der Injektion

4.2.3.1 CK bei Saugferkeln am 3. Lebenstag

Die mittleren Serumkonzentrationen, Standardabweichungen sowie Minimal- und Maximalkonzentrationen der im Serum von Saugferkeln am 3. Lebenstag gemessenen CK sind nach Gruppen aufgeteilt in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19 – Mittlere CK-Konzentrationen in U/l vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

t	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
basal	Nadel	31	111	52	32	294	0,051
	nadellos	30	214	295	45	1565	
30 Minuten	Nadel	31	184	167	59	1029	0,399
	nadellos	30	202	233	63	1286	
1 Stunde	Nadel	31	272	169	95	961	0,007
	nadellos	30	187	91	79	528	
4 Stunden	Nadel	31	326	217	102	1190	0,215
	nadellos	30	267	134	136	759	
24 Stunden	Nadel	31	136	61	59	371	0,778
	nadellos	30	155	104	59	436	

Die mittlere CK-Konzentration im Serum von Saugferkeln am 3. Lebenstag betrug vor der Injektion 214 U/l (nadellose Injektion) bzw. 111 U/l (Injektion mit Nadel). Der maximale Anstieg der Werte im Vergleich zur Basalkonzentration wurden in beiden Versuchsgruppen 4 Stunden nach der Injektion gemessen. Der Unterschied der Werte zwischen den Tieren, die eine nadellose Injektion bzw. eine Injektion mit Nadel erhalten hatten, war zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht signifikant. 1 Stunde nach der Injektion mit Nadel war die mittlere CK-Konzentration mit 95 U/l signifikant höher als nach der nadellosen Injektion mit 79 U/l ($p < 0,01$). Zu allen anderen Zeitpunkten traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auf.

4.2.3.2 CK bei Saugferkeln am 14. Lebenstag

Die mittleren Serumkonzentrationen, Standardabweichungen sowie Minimal- und Maximalkonzentrationen der im Serum von Saugferkeln am 14. Lebenstag gemessenen CK sind nach Gruppen aufgeteilt in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20 – Mittlere CK-Konzentrationen in U/l im Serum von Saugferkeln am 14. Lebenstag vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

t	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
basal	Nadel (NaCl)	31	289	156	118	773	0,910
	nadellos (NaCl)	31	344	360	137	2094	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	353	214	152	981	0,240
	nadellos (Vit-E-Se)	31	410	241	131	1084	
	Nadel (Eisen)	31	367	368	118	1740	0,197
	nadellos (Eisen)	30	376	361	141	1806	
30 Minuten	Nadel (NaCl)	31	429	279	142	1122	0,849
	nadellos (NaCl)	31	419	323	122	1830	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	578	407	195	1707	0,199
	nadellos (Vit-E-Se)	31	647	341	178	1488	
	Nadel (Eisen)	31	651	705	122	3105	0,584
	nadellos (Eisen)	30	517	446	154	2069	
1 Stunde	Nadel (NaCl)	31	477	327	213	1723	0,435
	nadellos (NaCl)	31	463	491	180	2905	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	1168	1155	234	5621	0,614
	nadellos (Vit-E-Se)	31	964	550	328	2893	
	Nadel (Eisen)	31	576	469	208	1940	0,863
	nadellos (Eisen)	30	490	270	220	1346	
4 Stunden	Nadel (NaCl)	31	546	532	174	2815	0,983
	nadellos (NaCl)	31	595	659	133	2850	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	1563	1358	313	6160	0,237
	nadellos (Vit-E-Se)	31	1127	625	396	2975	
	Nadel (Eisen)	31	735	577	143	2287	0,306
	nadellos (Eisen)	30	694	600	246	2916	
24 Stunden	Nadel (NaCl)	31	431	579	127	3300	0,910
	nadellos (NaCl)	31	454	442	139	1793	
	Nadel (Vit-E-Se)	30	517	520	119	2737	0,151
	nadellos (Vit-E-Se)	31	644	612	160	3251	
	Nadel (Eisen)	31	463	390	147	2000	0,387
	nadellos (Eisen)	30	713	708	130	2911	

Die mittlere CK-Konzentration im Serum von Saugferkeln am 14. Lebenstag schwankte vor der Injektion im Bereich zwischen 289 und 410 U/l. Der maximale Anstieg der Werte im Vergleich zur Basalkonzentration wurde in allen 6 Versuchsgruppen 4 Stunden nach der Injektion gemessen. Der Unterschied der Werte zwischen den Tieren, die eine nadellose Injektion bzw. eine Injektion mit Nadel erhalten hatten, war zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Bei den Tieren der Gruppe 3 (NaCl mit Nadel) war der maximale Anstieg der mittleren CK-Konzentration 4 Stunden nach der Injektion in Relation zum Basalwert signifikant erhöht. Bei den Tieren der Gruppe 4 (NaCl nadellos) unterschied er sich jedoch nicht signifikant vom Basalwert.

Bei den Gruppen 7 (Eisendextran mit Nadel) und 8 (Eisendextran nadellos) war der maximale Anstieg der mittleren CK-Konzentration 4 Stunden nach der Injektion signifikant höher als der Basalwert.

Bei den Gruppen 5 (Vitamin-E-Selen mit Nadel) und 6 (Vitamin-E-Selen nadellos) waren die mittleren Werte 30 Minuten, 1 Stunde und 4 Stunden nach der Injektion signifikant höher als der Basalwert ($p < 0,01$).

4.2.3.3 CK/AST-Quotient

Das mittlere Verhältnis zwischen den CK- und AST-Konzentrationen im Serum von Saugferkeln, dessen Standardabweichungen, Minimal- und Maximalwerte sowie die p-Werte des Vergleiches zwischen nadelloser Injektion und Injektion mit Nadel sind nach Injektionspräparat aufgeteilt in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 21 – Mittleres Verhältnis zwischen CK und AST im Serum von Saugferkeln am vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

t	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
basal	Nadel (Eisen - 3.LT)	31	4	2	2	9	0,051
	nadellos (Eisen - 3.LT)	30	5	2	2	13	
	Nadel (NaCl - 14.LT)	31	8	4	4	27	0,910
	nadellos (NaCl - 14.LT)	31	8	4	5	20	
	Nadel (Vit-E-Se - 14.LT)	30	9	4	4	17	0,240
	nadellos (Vit-E-Se - 14.LT)	31	10	5	2	21	
	Nadel (Eisen - 14.LT)	31	10	6	5	32	0,197
	nadellos (Eisen - 14.LT)	30	11	5	5	27	
30 Minuten	Nadel (Eisen - 3.LT)	31	6	2	3	14	0,399
	nadellos (Eisen - 3.LT)	30	6	3	3	14	
	Nadel (NaCl - 14.LT)	31	10	5	4	26	0,849
	nadellos (NaCl - 14.LT)	31	10	4	5	22	
	Nadel (Vit-E-Se - 14.LT)	30	13	5	6	26	0,199
	nadellos (Vit-E-Se - 14.LT)	31	15	5	7	25	
	Nadel (Eisen - 14.LT)	31	13	6	4	26	0,584
	nadellos (Eisen - 14.LT)	30	13	5	6	26	
1 Stunde	Nadel (Eisen - 3.LT)	31	8	3	4	15	0,007
	nadellos (Eisen - 3.LT)	30	6	2	3	11	
	Nadel (NaCl - 14.LT)	31	11	4	5	22	0,435
	nadellos (NaCl - 14.LT)	31	10	4	5	25	
	Nadel (Vit-E-Se - 14.LT)	30	18	7	6	32	0,614
	nadellos (Vit-E-Se - 14.LT)	31	19	5	10	31	
	Nadel (Eisen - 14.LT)	31	14	5	6	29	0,863
	nadellos (Eisen - 14.LT)	30	13	5	7	25	
4 Stunden	Nadel (Eisen - 3.LT)	31	8	3	4	17	0,215
	nadellos (Eisen - 3.LT)	30	7	2	5	13	
	Nadel (NaCl - 14.LT)	31	10	4	5	22	0,983
	nadellos (NaCl - 14.LT)	31	10	4	5	21	
	Nadel (Vit-E-Se - 14.LT)	30	20	7	8	42	0,237
	nadellos (Vit-E-Se - 14.LT)	31	19	6	9	33	
	Nadel (Eisen - 14.LT)	31	14	5	6	24	0,306
	nadellos (Eisen - 14.LT)	30	15	6	5	31	
24 Stunden	Nadel (Eisen - 3.LT)	31	4	2	2	8	0,778
	nadellos (Eisen - 3.LT)	30	5	3	3	14	
	Nadel (NaCl - 14.LT)	31	9	5	4	29	0,910
	nadellos (NaCl - 14.LT)	31	9	5	4	20	
	Nadel (Vit-E-Se - 14.LT)	30	11	6	5	30	0,151
	nadellos (Vit-E-Se - 14.LT)	31	13	5	6	22	
	Nadel (Eisen - 14.LT)	31	11	5	5	23	0,387
	nadellos (Eisen - 14.LT)	30	14	7	4	28	

Das mittlere Verhältnis von CK zu AST schwankte bei allen Gruppen in einem Bereich von 4 – 20 und überschritt den Wert von 20 in keinem Fall. Die Einzelwerte schwankten insgesamt zwischen Maximalwerten von 32 und Minimalwerten von 2. Bei Ferkeln im Alter von 3 Lebenstagen war der mittlere CK/AST Quotient zu jedem Messzeitpunkt deutlich niedriger als bei den Ferkeln im Alter von 14 Lebenstagen. Bei 63 von 184 Saugferkeln im Alter von 14 Lebenstagen trat zu mindestens einem Messzeitpunkt ein Quotient von ≥ 20 auf, wobei diese Tiere in 89% der Fälle aus den Gruppen stammten, die eine Injektion mit Vitamin-E-Selen oder Eisendextran erhalten hatten.

4.2.4 Eisen

Die Messung der Eisenkonzentration im Serum erfolgte bei den 122 Tieren der Gruppen, die eine Injektion mit Eisendextran erhalten hatten. Die Eisenkonzentration im Serum von Saugferkeln stieg nach der Applikation von Eisendextran innerhalb von 4 Stunden auf die gemessenen Maximalwerte an und fiel 24 Stunden nach der Injektion wieder ab.

4.2.4.1 Saugferkel am 3. Lebenstag

Die mittleren Serumkonzentrationen, Standardabweichungen sowie Minimal- und Maximalkonzentrationen der Eisenkonzentration im Serum von Saugferkeln am 3. Lebenstag sind nach Gruppen aufgeteilt in Tabelle 22 zusammengefasst.

Tabelle 22 – Mittlere Eisenkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ vor sowie 30 min, 1 h, 4 h, 24 h, 7 d, 14 d, 21 d und 28 d nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

t	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
basal	Nadel	31	8,8	7,0	0,3	31,4	0,71
	nadellos	30	9,4	6,4	1,7	25,2	
30 Minuten	Nadel	31	34,7	12,4	11,1	65,3	<0,01
	nadellos	30	20,8	9,9	7,9	41,9	
1 Stunde	Nadel	31	63,2	25,6	23,5	132,6	<0,01
	nadellos	30	32,6	12,6	7,9	62,1	
4 Stunden	Nadel	31	105,0	28,5	59,8	178,4	<0,01
	nadellos	30	58,5	20,5	21,4	122,3	
24 Stunden	Nadel	31	51,7	13,0	25,8	78,2	<0,01
	nadellos	30	40,9	11,9	21,3	69,4	
7. Tag	Nadel	31	35,0	10,4	8,7	53,5	0,03
	nadellos	30	30,0	8,1	12,6	46,4	
14. Tag	Nadel	31	31,3	8,2	14,8	55,6	<0,01
	nadellos	30	21,3	7,0	6,0	35,0	
21. Tag	Nadel	31	28,5	7,5	6,3	41,9	<0,01
	nadellos	30	20,8	8,6	4,2	38,0	
28. Tag	Nadel	31	25,6	7,3	16,0	43,6	0,53
	nadellos	30	27,0	8,5	11,7	43,5	

Die mittlere Eisenkonzentration vor der Injektion lag bei den Saugferkeln am 3. Lebenstag bei 9,4 $\mu\text{mol/l}$ (nadellos) und 8,8 $\mu\text{mol/l}$ (Nadel) und unterschied sich nicht signifikant voneinander. Die Werte stiegen 4 Stunden nach der nadellosen Injektion auf mittlere Maximalkonzentrationen von 58,5 $\mu\text{mol/l}$ und nach der Injektion mit Nadel auf 105,0 $\mu\text{mol/l}$. Der Anstieg im Vergleich zum Basalwert war bei beiden Injektionsmethoden signifikant ($p < 0,01$).

Zum Messzeitpunkt 24 Stunden nach der Injektion sanken die Werte auf 40,9 $\mu\text{mol/l}$ nach der nadellosen Injektion und auf 51,7 $\mu\text{mol/l}$ nach der Injektion mit Nadel. Zu den Messzeitpunkten 30 Minuten, 1 Stunde, 4 Stunden, 24 Stunden, und alle 7 Tage

bis zum Absetzen war die Eisenkonzentration nach der Injektion mit Nadel signifikant höher als nach der nadellosen Injektion. Zum Zeitpunkt des Absetzens betrugen die Werte bei den Tieren, die eine nadellose Injektion erhalten hatten, auf 27,0 $\mu\text{mol/l}$ und bei den Tieren, die eine Injektion mit Nadel erhalten hatten, auf 25,6 $\mu\text{mol/l}$. Zu diesem Zeitpunkt bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten mehr. Abbildung 9 zeigt den Verlauf der Eisenkonzentration im Vergleich zwischen den Injektionsmethoden.

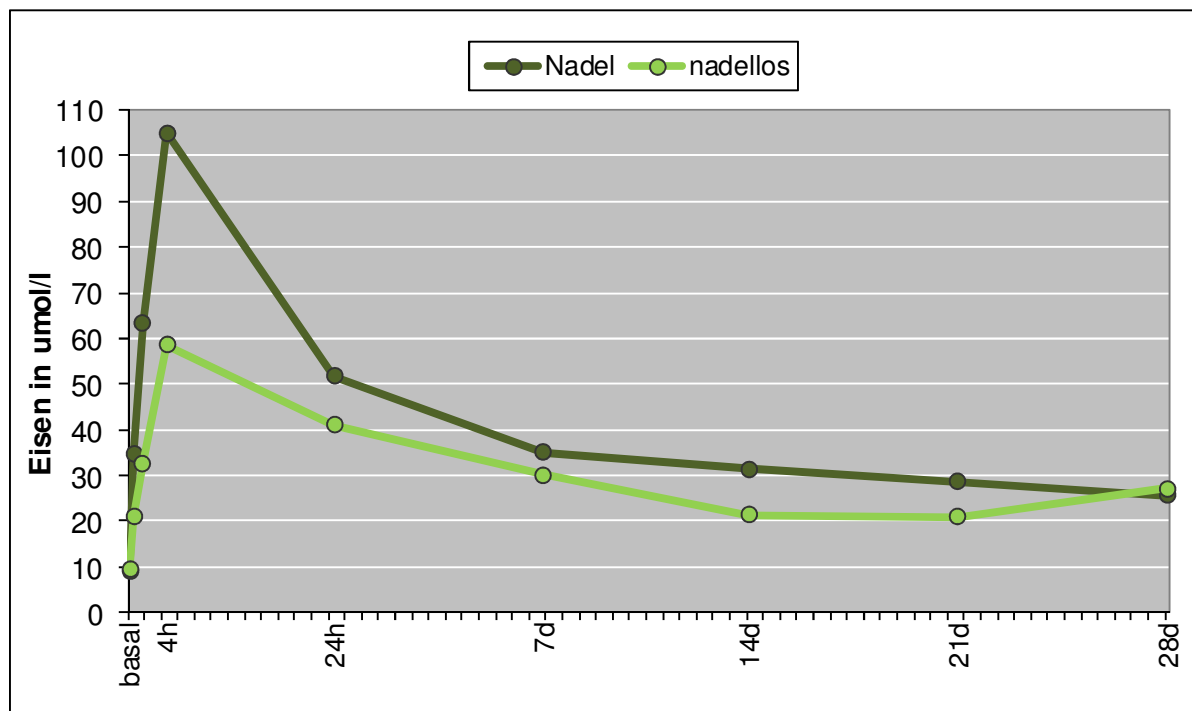


Abbildung 9 – Verlauf der mittleren Eisenkonzentration im Serum von Saugferkeln nach der Injektion von Eisendextran am 3. Lebenstag, durch Interpolation der Messwerte

4.2.4.2 Saugferkel am 14. Lebenstag

Die mittleren Serumkonzentrationen, Standardabweichungen sowie Minimal- und Maximalkonzentrationen der Eisenkonzentration im Serum von Saugferkeln am 14. Lebenstag sind nach Gruppen aufgeteilt in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tabelle 23 – Mittlere Eisenkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden

t	Gruppe	n	MW	SD	Min.	Max.	p
basal	Nadel	31	36,5	6,6	21,2	50,6	0,02
	nadellos	30	31,2	9,4	9,9	52,61	
30 Minuten	Nadel	31	47,4	9,2	25,1	71,66	<0,01
	nadellos	30	39,1	10,1	13,1	58,51	
1 Stunde	Nadel	31	51,9	9,4	27,5	75,4	<0,01
	nadellos	30	43,8	9,9	27,8	61,3	
4 Stunden	Nadel	31	67,9	10,5	44,1	88,25	<0,01
	nadellos	30	55,4	11,9	29,2	78,8	
24 Stunden	Nadel	31	41,8	11,2	14,3	62,0	0,05
	nadellos	30	36,6	7,6	23,5	52,6	

Die mittlere Eisenkonzentration vor der Injektion lag bei Ferkeln dieser Altersgruppe mit 31,2 $\mu\text{mol/l}$ (nadellose Injektion) und 36,5 $\mu\text{mol/l}$ (Injektion mit Nadel) signifikant höher als bei den Saugferkeln am 3. Lebenstag ($p < 0,01$). Abbildung 10 zeigt den Verlauf der Eisenkonzentration im Serum vor und nach der Injektion.

Der maximale Anstieg der mittleren Messwerte im Vergleich zu den Werten vor der Injektion wurde 4 Stunden nach der nadellosen Injektion (55,4 $\mu\text{mol/l}$) und 4 Stunden nach der Injektion mit Nadel (67,9 $\mu\text{mol/l}$) gemessen. Zu diesem Messzeitpunkt sowie 30 Minuten und 1 Stunde nach der Injektion waren die Werte bei der nadellosen Injektion signifikant höher als nach der Injektion mit Nadel ($p < 0,01$).

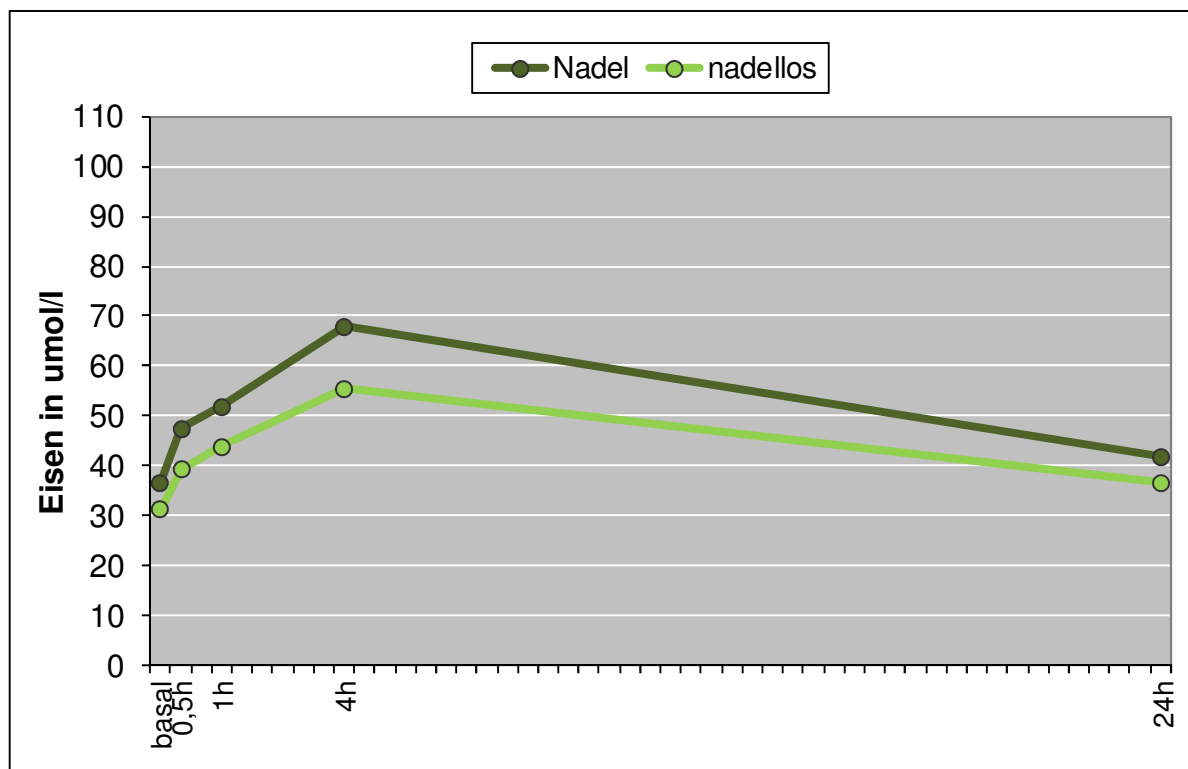


Abbildung 10 – Verlauf der mittleren Eisenkonzentration im Serum von Saugferkeln nach der Injektion von Eisendextran am 3. Lebenstag, durch Interpolation der Messwerte

4.3 Pathoanatomische und histologische Untersuchung

Von den 36 für die pathologische Untersuchung vorgesehenen Tieren konnten alle Tiere der Sektion und der folgenden makroskopischen und histopathologischen Untersuchung unterzogen werden. Allerdings war bei einem Tier die Beurteilung der Untersuchungsebene 5 nicht möglich. Bei diesem Tier reichte die Länge des Gewebestückes aus der Halsmuskulatur nicht aus, um 5 Untersuchungsebenen anzufertigen. Es wurden daher nur die Untersuchungsebenen 1 bis 4 untersucht.

4.3.1 Makroskopische Untersuchung

4.3.1.1 Lokalreaktion

Die klinische Untersuchung der makroskopisch sichtbaren Lokalreaktion wurde bei 24 von insgesamt 36 Tieren 4 Stunden nach der Injektion von Eisendextran und

Vitamin-E-Selen durchgeführt und ist in Tabelle 24 dargestellt. Nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung wurde die klinische Untersuchung der Lokalreaktion an der Injektionsstelle unterlassen, da nach der Injektion keine auffälligen Lokalreaktionen beobachtet wurden. Erst nach den offensichtlichen Befunden in Bezug auf die Lokalreaktionen nach der Injektion von Eisendextran und Vitamin-E-Selen, wurde die adspektorische und palpatorische Untersuchung der Injektionsstelle mit in den Versuch einbezogen und dokumentiert.

Tabelle 24 – Bewertung der Merkmale Umfangsvermehrung, Verfärbung, Verhärtung und deren Ausdehnung in cm sowie die Blutung an der Injektionsstelle

			Tiernr.	Aus- dehnung	Umfangs- vermehrung	Ver- färbung	Ver- härtung	Blutung
Vit-E-Se	24h	Nadel	13	3	2	4	4	3
			14	1	2	3	3	3
			15	1	1	2	2	2
		nadellos	16	0,5	0	0	2	0
			17	0,5	0	0	1	3
			18	2	3	3	3	1
	7d	Nadel	19	0,5	0	1	1	0
			20	0,5	0	1	3	0
			21	0	0	0	0	3
		nadellos	22	1,5	1	3	3	3
			23	0,5	0	2	1	3
			24	2	3	2	3	3
Eisen	24h	Nadel	25	0,5	0	2	2	0
			26	0,5	0	2	1	0
			27	0,5	0	2	2	0
		nadellos	28	3	2	3	3	0
			29	3	0	3	3	0
			30	1	0	3	2	0
	7d	Nadel	31	0,5	0	1	1	0
			32	0	0	0	0	0
			33	0,5	1	1	2	0
		nadellos	34	1	0	3	2	0
			35	1	1	3	2	0
			36	1	0	3	1	0

Bewertungsschema: 0 = keine Veränderung, 1 = andeutungsweise verändert, 2 = geringgradig verändert, 3 = mittelgradig verändert, 4 = hochgradig verändert

Nach der nadellosen Injektion von Vitamin-E-Selen trat bei je einem Tier eine mittelgradige Umfangsvermehrung auf. Bei den restlichen 22 von 24 Tieren traten geringgradige oder weniger ausgeprägte Umfangsvermehrungen auf.

Bei 8 Tieren traten nach der nadellosen Injektion mittel- bis hochgradige Verfärbungen in Form von Rötungen bzw. rötlich-braunen Verfärbungen der Injektionsstelle auf. Davon hatten 2 Tiere eine Injektion mit Vitamin-E-Selen erhalten und 6 mit Eisendextran. Mittel- bis hochgradige Verfärbungen nach der Injektion mit Nadel traten bei 2 Tieren nach der Injektion von Vitamin-E-Selen auf.

Mittel- bis hochgradige Verhärtungen der Injektionsstelle traten nach der Injektion von Vitamin-E-Selen bei 6 Tieren auf. Davon hatten 3 Tiere eine nadellose Injektion und 3 Tiere eine Injektion mit Nadel erhalten. Nach der Injektion von Eisen traten bei 2 Tieren Verhärtungen an der Injektionsstelle auf. Beide Tiere hatten eine nadellose Injektion erhalten.

Nach der Injektion von Eisendextran wurden keine Blutungen beobachtet. Mittel-gradige Blutungen traten bei 7 Tieren nach der Injektion von Vitamin-E-Selen auf. Davon hatten 3 eine Injektion mit Nadel und 4 eine nadellose Injektion erhalten.

4.3.1.2 Transversalschnitt

Bei der Präparation des Transversalschnittes der Nackenmuskulatur fielen bei 13 von 18 Tieren Blutungen im Bindegewebe zwischen den Muskeln auf, wenn die Injektion 24 Stunden zurücklag. Von diesen 13 Tieren hatten 8 eine Injektion mit Kanüle erhalten, dagegen 5 eine nadellose Injektion. Die blutige Durchtränkung des Fett- und Bindegewebes und der angrenzenden Muskulatur war auf die linke Hälfte der Halsmuskulatur beschränkt, an welcher die Injektionsstelle stattgefunden hatte.

Von diesen 13 Tieren waren am häufigsten diejenigen von einer mittel- bis hochgradigen blutigen Verfärbung betroffen, bei denen Injektionspräparate mit höherer Viskosität (Vit-E-Se > Eisendextran > NaCl) injiziert wurden. 6 der Tiere hatten eine Injektion mit Vitamin-E-Selen, 5 Tiere eine Injektion mit Eisendextran und 2 Tiere eine Injektion mit isotonischer Kochsalzlösung erhalten.

Nach 7 Tagen waren dagegen makroskopisch bei keinem der Tiere Einblutungen zu erkennen.

Die Verteilung des Injektionspräparates an der Injektionsstelle konnte bei den 12 Ferkeln der Versuchsgruppe, die eine Injektion mit Eisendextran erhalten hatten, anhand dessen dunkelbrauner Farbe makroskopisch nachvollzogen werden.

Sowohl nach Injektionen, die 24 Stunden zurücklagen, als auch nach 7 Tagen trat eine diffuse bräunliche Verfärbung von Fett- und Bindegewebe sowie der

angrenzenden Muskulatur an der Injektionsstelle auf. Abbildung 11 zeigt Transversalschnitte mit typischem durch Eisendextran verursachten Verfärbungsmuster 24 Stunden nach der Injektion. Auch nach 7 Tagen war dieses Verteilungsmuster in den Transversalschnitten erhalten, der bräunliche Farbton war in diesen Fällen jedoch von geringerer farblicher Intensität. Die graue Verfärbung der Muskulatur in der Peripherie des Nackenstückes kam durch die Fixierung in Formalin zustande, während an den rosarot gefärbten Bezirken deren native Farbe durch unvollständige Fixierung in Formalin erhalten blieb.

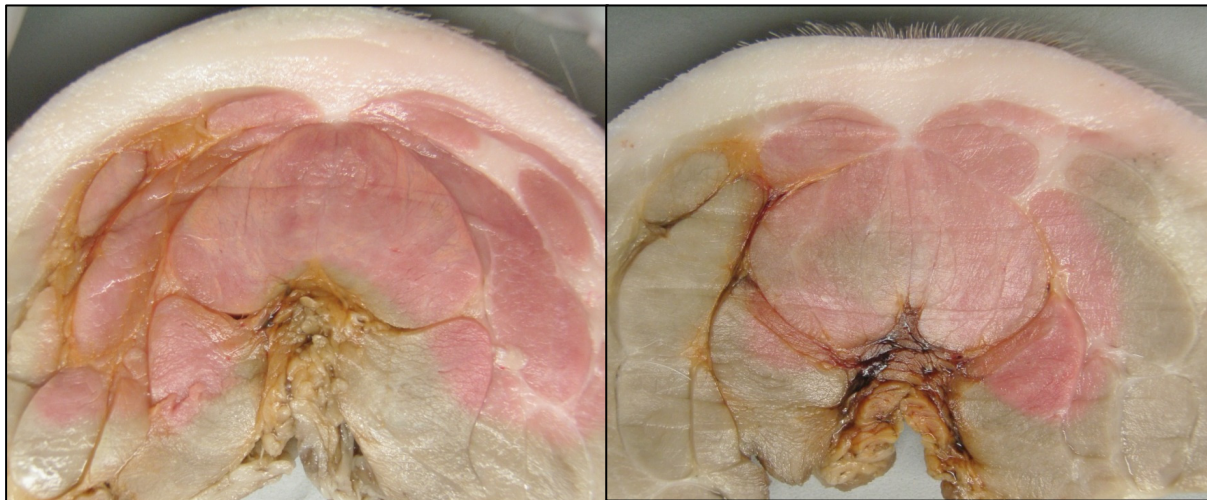


Abbildung 11 – Verteilung von Eisendextran im Gewebe an der Injektionsstelle, betrachtet am Transversalschnitt aus der Halsmuskulatur, links: 24 Stunden nach nadelloser Injektion und rechts: 24 Stunden nach Injektion mit Nadel

4.3.1.3 Untersuchungsebenen

Die im Transversalschnitt beobachteten Einblutungen im Fett- und Bindegewebe sowie der angrenzenden Muskulatur waren nach dem Zuschneiden in die Untersuchungsebenen nachvollziehbar. Auch die bräunliche Verfärbung von Fett- und Bindegewebe sowie der angrenzenden Muskulatur war nach der Injektion von Eisendextran in den einzelnen Untersuchungsebenen wiederum erkennbar.

Wenn die Injektion 24 Stunden zurücklag war die Injektionsstelle auf der Haut bei allen Tieren anhand der Lokalreaktion eindeutig erkennbar. Wenn sie 7 Tage zurücklag war die Injektionsstelle im Falle von Eisendextran bei allen 6 Tieren und im Falle von Vitamin-E-Selen bei 5 von 6 Tieren makroskopisch erkennbar. Nach der

Injektion von isotonischer Kochsalzlösung konnte bei keinem der 6 Tiere die Lokalreaktion an der Injektionsstelle erfasst werden.

Bei den 7 Tieren, auf deren Haut die Injektionsstelle nicht äußerlich erkennbar war, diente die tätowierte Markierung zur Lokalisierung der Injektionsregion. Der Schnittpunkt der beiden Verbindungslinien zwischen je zwei gegenüberliegenden tätowierten Punkten, die einander kreuzförmig schnitten, bildete das Zentrum der Injektionsstelle ab. Um dieses Zentrum wurde senkrecht zur Haut ein Gewebeblock mit einem Durchmesser von ca. 20 mm herausgeschnitten.

Die Verteilung des Injektionspräparates in den einzelnen Untersuchungsebenen konnte bei den 12 Ferkeln der Versuchsgruppe, die eine Injektion mit Eisendextran erhalten hatten, anhand dessen dunkelbrauner Farbe makroskopisch nachvollzogen werden. Die Verfärbung des subkutanen Fettgewebes unmittelbar unter der Haut (Untersuchungsebene 1P) 24 Stunden und 7 Tage jeweils nach der Injektion mit Nadel und der nadellosen Injektion sind auf Abbildung 12 und Abbildung 13 zu sehen.

Nach beiden Injektionsmethoden trat hier ein umschriebener, ovaler bräunlich verfärbter Bezirk von unterschiedlicher Ausdehnung auf. Unabhängig vom Injektionszeitpunkt betrug die Ausdehnung der Verfärbung nach der Injektion mit Nadel etwa 10 x 5 mm, nach der nadellosen Injektion dagegen durchschnittlich etwa 25 x 15 mm. Die beobachteten Ausmaße der Verfärbung waren bei beiden Injektionszeitpunkten gleich, während die Farbintensität 24 Stunden nach der Injektion etwas stärker ausgeprägt war als 7 Tage nach der Injektion.

Das Muster der Verfärbung war nach der Injektion mit Nadel unabhängig vom Injektionszeitpunkt homogen, wie auf Abbildung 12 links und Abbildung 13 links zu sehen ist.

Dagegen war nach der nadellosen Injektion bei 4 von 6 Tieren ein blasser Bezirk von 5 mm im Durchmesser um die Perforationsstelle zu erkennen. In dessen Umgebung fand sich ein ringförmiges, deutlich braun-rot verfärbtes Areal von bis zu 25 mm im Durchmesser. Dieser Befund war bei den 3 Tieren besonders deutlich ausgeprägt, bei denen die Injektion 7 Tage zurücklag (Abbildung 13 rechts). Bei einem von 3 Tieren, bei dem die Injektion 24 Stunden zurücklag trat dieser Befund ebenso auf (Abbildung 12 rechts), während bei den restlichen 2 Tieren eine überwiegend

homogene bräunliche Verfärbung auftrat und eine Ringbildung nur andeutungsweise ersichtlich war.

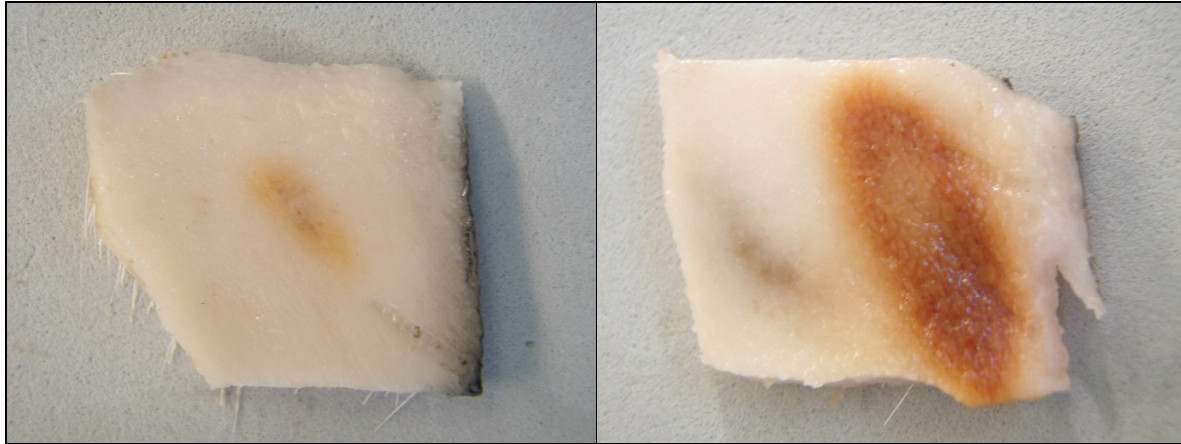


Abbildung 12 – Injektionsstelle in der ersten Untersuchungsebene (1P), 24 Stunden nach der Injektion von Eisendextran. Links nach Injektion per Nadel, rechts nach der nadellosen Injektion.

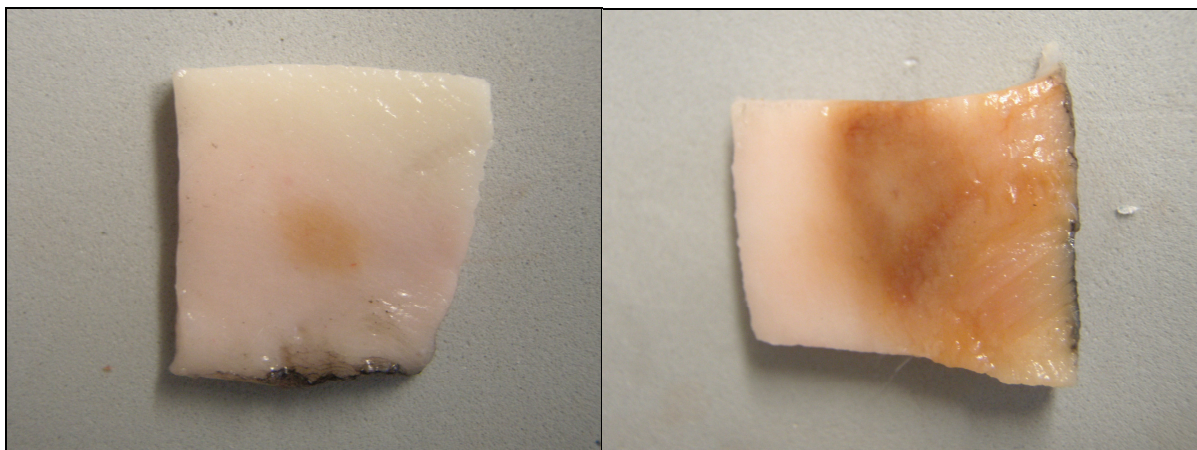


Abbildung 13 – Injektionsstelle in der ersten Untersuchungsebene (1P), 7 d nach der Injektion von Eisendextran. Links nach Injektion per Nadel, rechts nach der nadellosen Injektion.

4.3.2 Histologische Untersuchung

Bei allen 36 Tieren konnte bei der histologischen Untersuchung eine Entzündungsreaktion auf mindestens 2 Untersuchungsebenen beobachtet werden. Diese grenzten nicht in jedem Fall aneinander. 24 Stunden nach Injektion dominierten neutrophile Granulozyten das Entzündungsgeschehen, während nach 7 Tagen vorherrschend Lymphozyten, Plasmazellen oder Makrophagen auftraten. Das

Ausmaß der Entzündung ist für jedes Tier und jede Untersuchungsebene in Abhängigkeit vom Injektionszeitpunkt, der Injektionsmethode und dem Injektionspräparat in Tabelle 25 dargestellt.

Tabelle 25 — Ausprägung der Entzündung bei jedem Tier in den Untersuchungsebenen 1P bis 5P

			Tiernr.	1P	2P	3P	4P	5P
NaCl	24 h	Nadel	1	++	++	++	+	0
			2	++	++	+	0	0
			3	++	++	0	0	0
		nadellos	4	++	0	+	0	0
			5	++	++	0	0	0
			6	++	+	0	0	0
	7d	Nadel	7	0	+	+	++	0
			8	+	+	+	+	0
			9	+	+	++	+	0
		nadellos	10	+	+	0	0	0
			11	++	+	++	0	0
			12	++	++	++	0	0
Vit-E-Se	24 h	Nadel	13	+	+	++	++	++
			14	+	++	++	++	+
			15	++	++	++	++	++
		nadellos	16	++	++	++	++	++
			17	++	++	++	++	++
			18	++	++	++	++	+
	7d	Nadel	19	+	++	++	++	++
			20	0	++	+	++	++
			21	++	++	++	++	++
		nadellos	22	++	++	++	++	X
23	+		+	++	++	++		
24	++		++	++	+	0		
Eisen	24 h	Nadel	25	+	++	++	++	++
			26	0	++	++	++	+
			27	++	++	++	+	++
		nadellos	28	++	++	0	0	0
			29	+	++	++	++	+
			30	+	++	++	0	+
	7d	Nadel	31	0	0	++	+	0
			32	0	++	++	++	++
			33	+	++	++	++	++
		nadellos	34	+	++	0	0	0
			35	0	0	++	++	0
			36	++	++	+	+	0

(0 = keine Entzündung, + = geringgradige Entzündung, ++ = mittel- bis hochgradige Entzündung, X = Untersuchung nicht vorhanden)

In dieser Darstellung der Entzündungsreaktion verteilt auf die Untersuchungsebenen 1P – 5P ist die Tendenz zu erkennen, dass die Ebenen mit Entzündung nach der nadellosen Injektion in den oberflächlichen Ebenen überwogen, während nach der Injektion mit Nadel die Entzündung gehäuft in der Tiefe vorkam.

Die Einstichstelle war unabhängig vom Injektionsverfahren auf der ersten Untersuchungsebene (1P) in 30 von 36 Fällen histologisch zu erkennen.

In den Untersuchungsebenen 2P – 5P konnte eine Perforationsstelle nicht mehr eindeutig identifiziert werden wenn sie sich im perimysialen Fett- und Bindegewebe befand. Im Gegensatz dazu war die Perforationsstelle innerhalb der Muskulatur anhand eines umschriebenen Fibroseareals sowie Reparationsversuchen in Form von Muskelfasersprossung Muskelfasernekrosen als solche erkennbar.

Eine Zerstörung von Muskelfasern konnte sowohl nach der Injektion mit Nadel als auch nach der nadellosen Injektion unabhängig vom Injektionspräparat beobachtet werden.

In einigen histologischen Präparaten wurden spaltförmige Hohlräume mit einer Länge von bis zu 15 mm an den Grenzflächen zwischen Muskelgewebe und perimysialen Bindegewebe unabhängig von der Injektionsmethode beobachtet.

4.3.2.1 Injektion von isotonischer Kochsalzlösung

Nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung wurden keine grundlegenden Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden im histologischen Entzündungsbild festgestellt. Tabelle 26 zeigt das Auftreten von verschiedenen Merkmalen der Entzündung an der Injektionsstelle. Die Merkmale gliedern sich in das Auftreten von neutrophilen Granulozyten, Makrophagen bzw. mehrkernige Riesenzellen, Lymphozyten, Plasmazellen, Erythrozyten, Exsudat in Form von Fibrin oder Plasma, die Anbildung von kollagenen Fasern, Fibrozyten bzw. Fibroblasten und der Zerstörung bzw. Regeneration von Muskelzellen.

Tabelle 26 – Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, aufgeteilt nach Entzündungszellen und sonstigen Merkmalen

			Entzündungszellen				sonstige Merkmale				
NaCl		Tiernr.	neutr. G.	MØ	Lym.	Plas.	Ery.	Ex.	Koll.	Fz./Fb.	Musk.
24h	Nadel	1	2	1	1	0	+	+	0	0	+
		2	2	1	1	0	+	+	0	+	+
		3	2	1	0	0	+	+	0	0	+
	nadellos	4	2	1	1	0	+	+	0	+	+
		5	2	1	1	0	+	+	0	+	0
		6	2	1	2	0	+	+	0	+	0
	7d	Nadel	7	1	1	2	2	+	0	+	+
			8	0	0	2	1	+	0	+	0
			9	0	2	1	1	0	0	+	+
		nadellos	10	1	2	1	1	0	0	+	+
			11	0	1	1	1	+	0	+	+
			12	0	1	1	0	+	0	+	+

Bewertungsschema: (0 = nicht vorhanden, 1 = geringer Anteil der Zellen am Entzündungsgeschehen, 2 = hoher Anteil der Zellen am Entzündungsgeschehen, 0 = nicht vorhanden, + = vorhanden)

Abkürzungen: neutr. G. = Neutrophile Granulozyten, MØ = Makrophagen, Lym. = Lymphozyten, Plas. = Plasmazellen, Ery. = Erythrozyten, Ex. = Exsudat, Koll. = Kollagenfasern, Fz./Fb. = Fibrozyten bzw. Fibroblasten, Musk. = Muskelfaserpathologie

4.3.2.1.1 24 Stunden nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung

Die Perforationsstelle war 24 Stunden nach Injektion von isotonischer Kochsalzlösung unabhängig vom Injektionsverfahren in der ersten Untersuchungsebene (1P) bei allen 6 Tieren histologisch nachvollziehbar. Bei den folgenden Untersuchungsebenen 2P – 5P konnte die Perforationsstelle in mindestens einer Ebene bei 3 Tieren nach der Injektion mit Nadel und bei 1 Tier nach der nadellosen Injektion identifiziert werden.

Befand sich die Perforationsstelle im Fett- oder Bindegewebe, bestand die zelluläre Zusammensetzung aus überwiegend neutrophilen Granulozyten mit vereinzelt Makrophagen und Lymphozyten. Zudem fanden sich Fibrinexsudate und vereinzelt Plasmaergüsse. Extravaskuläre Erythrozyten wurden als Zeichen von Einblutung ins Gewebe bei allen 6 Tieren in mindestens einer Untersuchungsebene festgestellt. In der oberflächlichen Untersuchungsebene (1P) zeigte sich im Bereich der Perforation fokal eine umschriebene Ansammlung von neutrophilen Granulozyten. Vereinzelt Lymphozyten und Makrophagen waren über einen Bereich mit einem Durchmesser von ca. 5 mm in der Peripherie der Einstichstelle verteilt. In den Untersuchungsebenen 2P – 5P war die Entzündung nicht fokal begrenzt, sondern erstreckte sich über bis zu ca. 15 mm lange Abschnitte des perimysialen Fett- und Bindegewebes.

Befand sich die Perforationsstelle hingegen nicht im Fett- oder Bindegewebe, sondern in der Muskulatur, war sie aufgrund eines auf maximal ca. 5 mm begrenzten Gebietes von Muskelfasernekrosen deutlicher umschrieben. Eine Perforation von Muskelgewebe war gekennzeichnet durch Zenkersche Degeneration mit resorptiver Entzündung sowie durch interstitielles Ödem, Fibrinexsudation und das Vorkommen neutrophiler Granulozyten, stellenweise zusammen mit Lymphozyten und Makrophagen (Abbildung 14).

Am Übergang zwischen Muskulatur und dem perimysialen Bindegewebe waren meist in der Nähe des Entzündungszentrums unabhängig von der Injektionsmethode ausgedehnte Hohlräume mit maximalen Durchmessern von 10 x 3 mm zu finden.

In der Untersuchungsebene 4 waren nach der nadellosen Injektion von isotonischer Kochsalzlösung in keinem Fall mehr Hinweise auf eine Entzündung vorhanden, und nach der Injektion mit Nadel in 1 von 3 Fällen. In der Untersuchungsebene 5 waren

nach der Injektion bei keinem der 6 Tiere mehr Hinweise auf eine Entzündung zu finden.

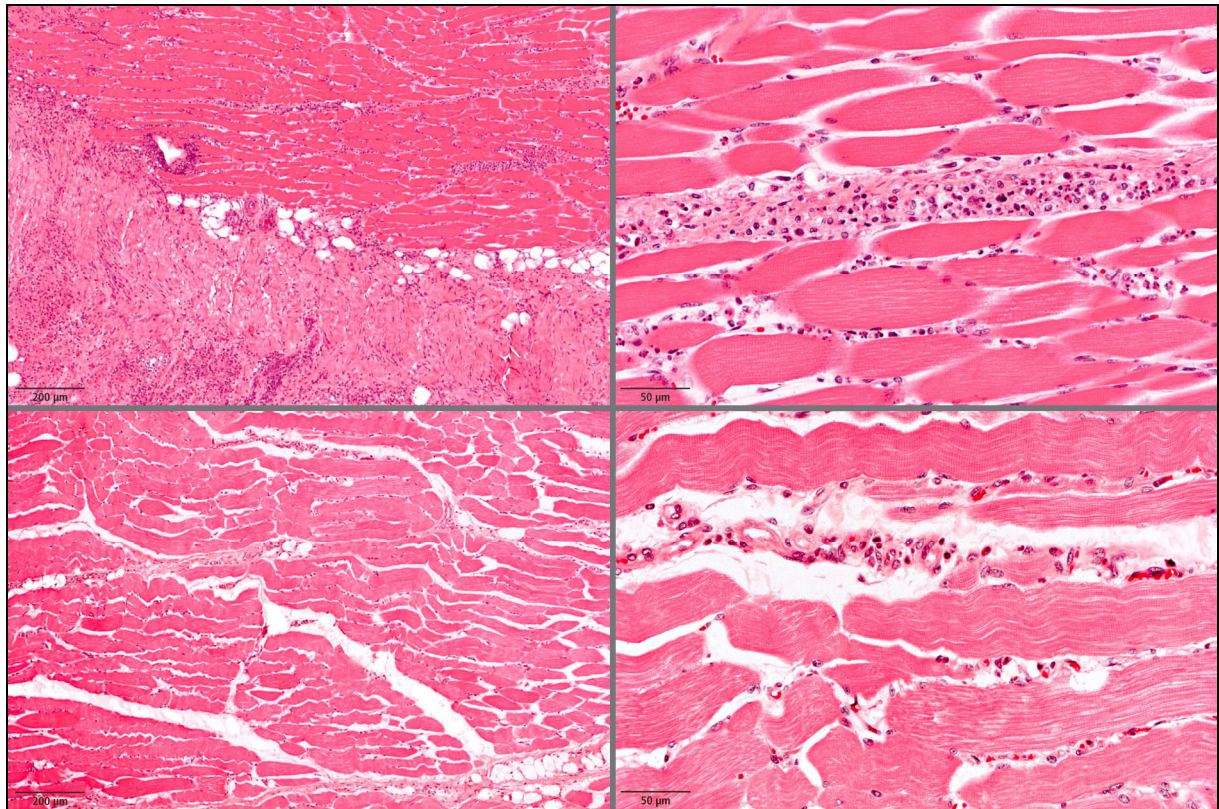


Abbildung 14 — NaCl Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion: Ggr. sternförmige endomysiale entzündliche Infiltration mit überwiegend neutrophilen Granulozyten sowie wenigen Makrophagen, zusätzlich ggr. Einblutung. Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel: Ggr. betont perivaskuläre entzündliche Infiltration mit einzelnen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen.

4.3.2.1.2 7 Tage nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung

Nach 7 Tagen waren Spuren der Einstichstelle in der ersten Untersuchungsebene bei 5 von 6 Tieren zu erkennen, davon hatten 2 Tiere eine Injektion mit Nadel und 3 eine nadellose Injektion erhalten. In den tieferen Untersuchungsebenen 2P – 5P waren Perforationsstellen bei 2 Tieren nach der nadellosen Injektion und bei 2 Tieren nach der Injektion mit Nadel in mindestens einer Untersuchungsebene identifizierbar. Befand sich das Entzündungszentrum im perimysialen Bindegewebe, fanden sich multifokale Fibroblasten- und Fibrozyten-Infiltrationen mit dem Nachweis kollagener Fasern. Dazu konnten auf einem Durchmesser von bis zu ca. 10 mm stellenweise geringgradige, perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate und vereinzelt Makrophagen gefunden werden. Spuren von Blutungen waren als vereinzelte Akkumulationen von extravaskulären Erythrozyten mit Nachweis von Erythrophagozytose bei jeweils 2 von 3 Tieren nach der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel zu finden.

Erkennbare Injektionsstellen in der Muskulatur bestanden aus endomysialer Fibrose mit Fibroblasten, Fibrozyten und kollagenen Fasern sowie Regenerationsversuchen in Form von Muskelfasersprossung. Ein geringgradiger resorptiver Entzündungsprozess einhergehend mit einer mäßigen Infiltration von Makrophagen konnte beobachtet werden. Nur in seltenen Fällen traten direkt an der Perforationsstelle Lymphozyten auf (Abbildung 15).

Unabhängig von der Injektionsmethode konnte auch 7 Tage nach der Injektion Hohlräume nachgewiesen werden, welche zu diesem Zeitpunkt eine Kapsel aus überwiegend Fibroblasten, Fibrozyten und wenigen Makrophagen und Ausmaßen von maximal etwa 10 x 3 mm aufwiesen.

In der Untersuchungsebene 4 waren nach der nadellosen Injektion von isotonischer Kochsalzlösung in keinem Fall Hinweise auf eine Entzündung vorhanden, und nach der Injektion mit Nadel in 3 von 3 Fällen. In der Untersuchungsebene 5 waren nach der Injektion bei keinem der 6 Tiere Hinweise auf eine Entzündung zu finden.

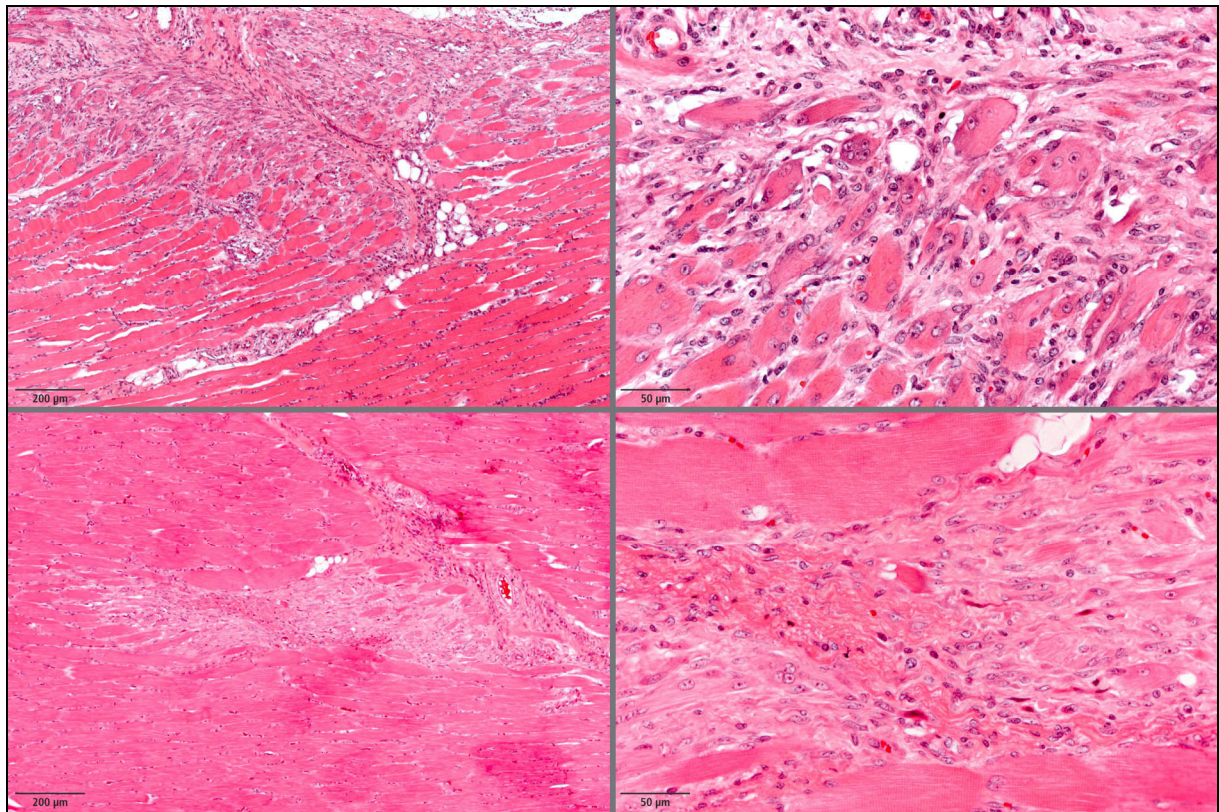


Abbildung 15 — NaCl Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion: Fokal sternförmig ausgedehnte Fibrose des Endomysiums mit zentraler Muskelfaseratrophie und Muskelfaseruntergang sowie peripheren Muskelknospen; resorptive Entzündung durch Makrophagen und einzelnen neutrophilen Granulozyten. Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: Kleinherdige Muskelnekrose und Fibrose mit kollagenen Fasern; endomysiale Fibrose der umgebenden Skelettmuskulatur; keine Entzündungszellinfiltrate in diesem Ausschnitt erkennbar.

4.3.2.2 Injektion von Vitamin-E-Selen

Nach der Injektion von Vitamin-E-Selen wurden bei der histologischen Untersuchung, unabhängig von der Injektionsmethode, keine grundlegenden Unterschiede im Entzündungsbild festgestellt. Ein Tier das eine nadellose Injektion 7 Tage vor Euthanasie erhalten hatte war nicht groß genug, um 5 Untersuchungsebenen aus dem entnommenen Nackenstück anzufertigen. Bei diesem Tier wurden daher nur die Untersuchungsebenen 1P bis 4P untersucht. Tabelle 27 zeigt das Auftreten der verschiedenen Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle.

Tabelle 27 – Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle nach der Injektion von Vitamin-E-Selen, aufgeteilt nach Entzündungszellen und sonstigen Merkmalen

			Entzündungszellen				sonstige Merkmale				
Vit-E-Se			neutr. G.	MØ	Lym.	Plas.	Ery.	Ex.	Koll.	Fz./Fb.	Musk.
24h	Nadel	13	2	1	1	0	+	+	0	0	+
		14	2	2	2	0	+	+	0	0	+
		15	2	1	2	0	+	+	0	0	+
	nadellos	16	2	2	1	0	+	+	0	0	+
		17	2	1	1	0	+	+	0	0	+
		18	2	1	2	1	+	+	0	0	+
7d	Nadel	19	0	1	1	0	0	+	+	+	+
		20	0	1	2	1	0	+	+	+	+
		21	1	1	2	1	+	+	+	+	+
	nadellos	22	1	2	2	1	+	+	+	+	+
		23	0	1	1	1	+	+	+	+	+
		24	0	1	2	0	+	+	+	+	+

Bewertungsschema: (0 = nicht vorhanden, 1 = geringer Anteil der Zellen am Entzündungsgeschehen, 2 = hoher Anteil der Zellen am Entzündungsgeschehen, 0 = nicht vorhanden, + = vorhanden)

Abkürzungen: neutr. G. = Neutrophile Granulozyten, MØ = Makrophagen, Lym. = Lymphozyten, Plas. = Plasmazellen, Ery. = Erythrozyten, Ex. = Exsudat, Koll. = Kollagenfasern, Fz./Fb. = Fibrozyten bzw. Fibroblasten, Musk. = Muskelfaserpathologie

4.3.2.2.1 24 Stunden nach der Injektion von Vitamin-E-Selen

Die Einstichstelle war in der ersten Untersuchungsebene (1P) in allen 6 Fällen nach der Injektion mit Nadel und der nadellosen Injektion erkennbar. Die Perforationsstelle innerhalb der folgenden Untersuchungsebenen 2P – 5P konnte unabhängig vom Injektionsverfahren bei allen 6 Tieren in mehreren Ebenen identifiziert werden. Ihr Durchmesser betrug bis zu 6 mm.

Das histologische Entzündungsbild war sowohl nach der nadellosen Injektion als auch nach der Injektion mit Nadel charakterisiert durch eine hochgradige Infiltration von neutrophilen Granulozyten, prominente Fibrinexsudation und Plasmaergüsse. Bei allen 6 Tieren traten extravaskuläre Erythrozyten als Zeichen von lokaler Einblutung auf. Stellenweise ergänzten Lymphozyten und Makrophagen das Entzündungsbild. Die Entzündung war nicht auf die Perforationsstelle konzentriert, sondern bildete Areale mit höchster Entzündungszelldichte im endomysialen Fettgewebe. Die Entzündungszellinfiltrate erstreckten sich über das perimysiale Fett- und Bindegewebe in seiner ganzen Länge (>15 mm), welches zum Teil die Hälfte einer Untersuchungsebene ausmachte. Injektionsstellen im Muskelgewebe waren erkennbar durch Zentren von Zenkerscher Degeneration mit resorptiver Entzündung, interstitiellem Ödem, Fibrinexsudation und neutrophilen Granulozyten, stellenweise zusammen mit Lymphozyten und Makrophagen (Abbildung 16).

Die Entzündung erstreckte sich in allen Fällen über alle Untersuchungsebenen (1P – 5P).

Am Übergang zwischen Muskulatur und dem perimysialen Bindegewebe waren unabhängig von der Injektionsmethode meist in der Nähe des Entzündungszentrums ausgedehnte Hohlräume mit histiozytärer Ummantelung und maximalen Durchmessern von etwa 10 x 3 mm zu finden.

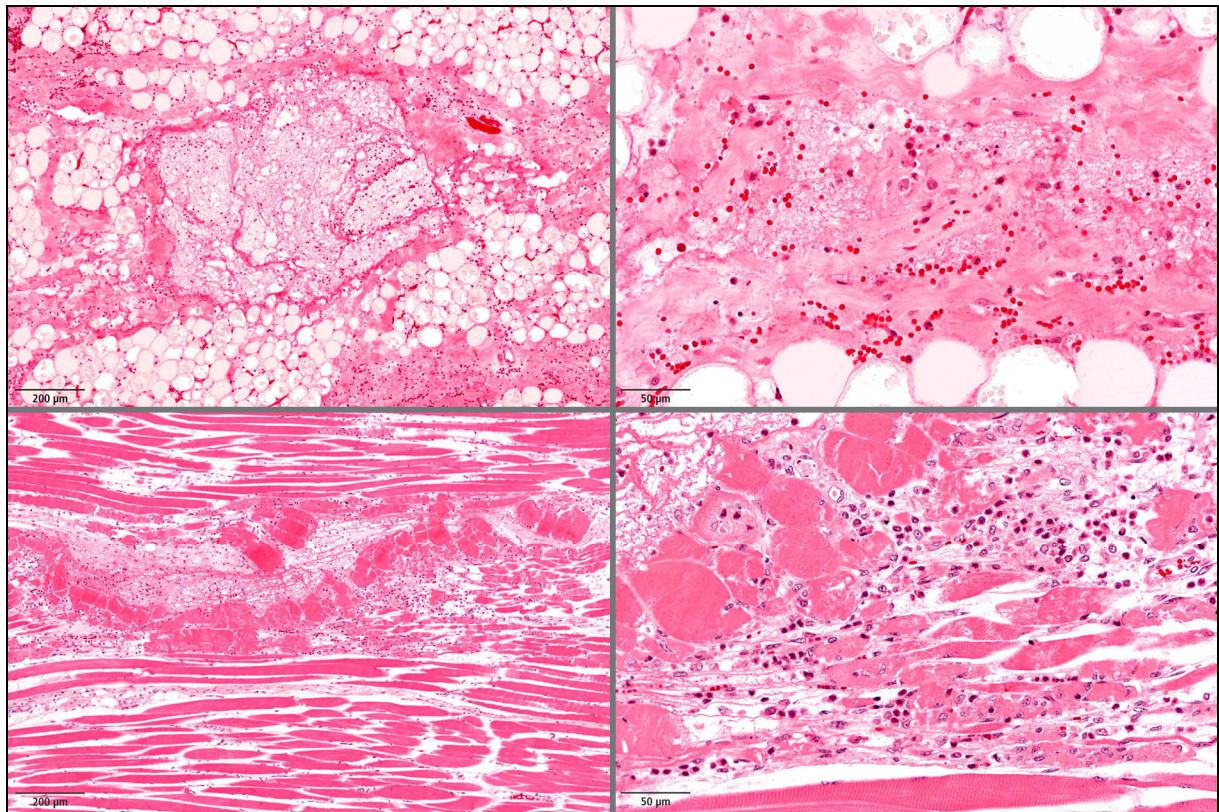


Abbildung 16 — Vit-E-Se Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion: Rund umschriebene hgr. ausgedehnte Fibrininsudation im Bereich des perimysialen Fettgewebes mit Fettgewebsnekrosen und multifokal ggr. Einblutung sowie ggr. Entzündungszellinfiltration unter Beteiligung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. **Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel:** Bandartig umschriebene hgr. ausgedehnte Fibrin-insudation mit gleichförmigem Muskelfaseruntergang und entzündlicher Infiltration durch neutrophile Granulozyten und einzelne Makrophagen.

4.3.2.2.2 7 Tage nach der Injektion von Vitamin-E-Selen

Die Perforationsstelle konnte in den Untersuchungsebene 1P – 5P bei allen Tieren unabhängig von der Injektionsmethode in mindestens einer Ebene lokalisiert werden. Die von der Injektion verursachte Perforationsstelle in der Muskulatur bestand aus einem Herd von degenerierten Muskelfasern. Dieser Bereich war gekennzeichnet durch Regenerationsversuche in Form von Muskelfasersprossung und teils ausgedehnte Fibrose mit dem Nachweis von kollagenen Fasern. Vereinzelt traten direkt an der Perforationsstelle Lymphozyten und Plasmazellen auf. Zudem konnte eine geringgradige resorptive Entzündung mit der Einwanderung von Makrophagen beobachtet werden. Von der Fibrose waren teilweise ganze Muskelfaserbündel in einer Länge von maximal ca. 10 mm betroffen (Abbildung 17).

Zusätzlich fanden sich im perimysialen Bindegewebe, unabhängig von der räumlichen Nähe zur Perforationsstelle in der Muskulatur, multifokale Fibroblasten- und Fibrozyten-Infiltrationen mit dem Nachweis kollagener Fasern, sowie mittelgradige perivaskuläre lymphoplasmazelluläre Infiltrate und vereinzelt Makrophagen. Stellenweise wurden fokale Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten nachgewiesen. Die Ausdehnung der Entzündungsmerkmale erstreckte sich über das perimysiale Fett- und Bindegewebe in seiner ganzen Länge (> 15 mm). Bereiche der Muskulatur, die direkt an das entzündete perimysiale Bindegewebe angrenzten, waren hochgradig von Muskelzelluntergang betroffen.

Spuren von Einblutungen ins Gewebe fanden sich in Form von vereinzelt extravaskulären Erythrozyten und dem Nachweis von Erythrophagozytose bei 1 von 3 Tieren nach der Injektion mit Nadel und bei allen 3 Tieren nach der nadellosen Injektion.

Bei 7 Tage alten Entzündungen konnten unabhängig von der Injektionsmethode Hohlräume nachgewiesen werden, welche zu diesem Zeitpunkt eine Kapsel aus überwiegend Fibroblasten, Fibrozyten und wenigen Makrophagen und Ausmaßen von maximal etwa 15 x 1 mm bzw. 8 x 6 mm aufwiesen.

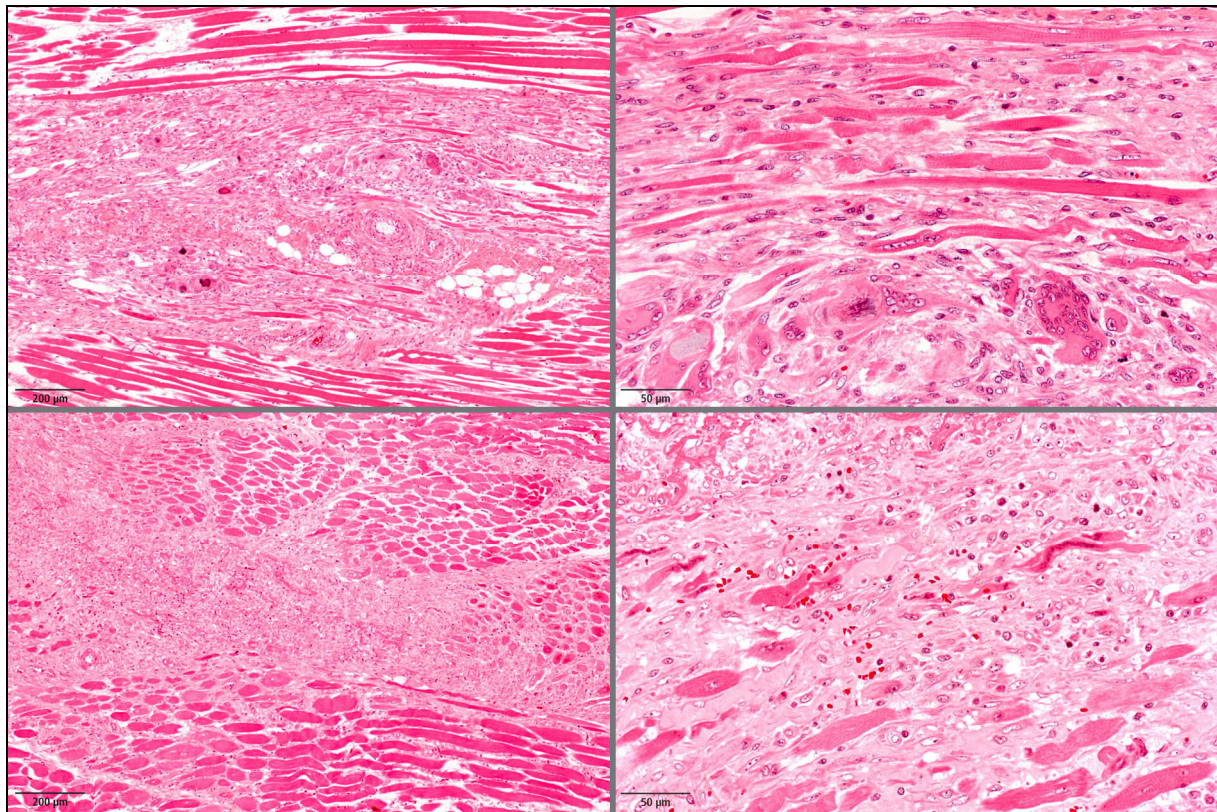


Abbildung 17 — Vit-E-Se Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion: Hochgradig ausgedehnte Fibrose innerhalb der Muskulatur; Muskelfaseruntergang und -atrophie, Nachweis einzelner mineralisierter Muskelfasern; daneben multiple Muskelknospen. Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: Sternförmig ausgedehnte Fibrose mit ggr. entzündlicher Infiltration durch Lymphozyten; hgr. periphere Muskelfaseratrophie sowie einzelne Muskelfaserknospen.

4.3.2.3 Injektion von Eisendextran

Zwischen der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel wurden im Fall von Eisendextran keine Unterschiede bei der histologischen Untersuchung festgestellt.

Tabelle 28 zeigt das Auftreten der verschiedenen Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle.

Tabelle 28 – Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle nach der Injektion von Eisendextran, aufgeteilt nach Entzündungszellen und sonstigen Merkmalen

			Entzündungszellen				sonstige Merkmale				
Eisen			neutr. G.	MØ	Lym.	Plas.	Ery.	Ex	Koll.	Fz./Fb.	Musk. Nekr.
24h	Nadel	25	2	2	1	0	+	+	0	0	+
		26	2	2	2	0	+	+	0	+	+
		27	2	1	1	0	+	+	0	0	+
	nadellos	28	2	1	2	1	+	+	0	+	0
		29	2	2	1	0	+	+	0	0	+
		30	2	1	1	0	+	+	0	0	+
	7d	Nadel	31	0	0	0	0	0	+	+	+
			32	2	1	2	+	0	+	+	+
			33	2	2	1	+	0	+	+	+
	nadellos	34	1	1	0	0	0	0	+	+	+
		35	0	0	0	0	0	0	+	+	+
		36	1	1	1	0	+	0	+	+	+

Bewertungsschema: (0 = nicht vorhanden, 1 = geringer Anteil der Zellen am Entzündungsgeschehen, 2 = hoher Anteil der Zellen am Entzündungsgeschehen, 0 = nicht vorhanden, + = vorhanden)

Abkürzungen: neutr. G. = Neutrophile Granulozyten, MØ = Makrophagen, Lym. = Lymphozyten, Plas. = Plasmazellen, Ery. = Erythrozyten, Ex. = Exsudat, Koll. = Kollagenfasern, Fz./Fb. = Fibrozyten bzw. Fibroblasten, Musk. = Muskelfaserpathologie

4.3.2.3.1 24 Stunden nach der Injektion von Eisendextran

Die Perforationsstelle war in mindestens einer der Untersuchungsebenen 1P – 5P in allen 3 Fällen nach der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel erkennbar. Ihr Durchmesser betrug bis zu 10 mm. Sie war gekennzeichnet durch hochgradige ausgedehnte Fibrin- und Plasmainsudation, Entzündungszellinfiltrate und Zenkerscher Degeneration der Muskulatur mit resorptiver Entzündung unter Beteiligung von neutrophilen Granulozyten, stellenweise zusammen mit Lymphozyten und Makrophagen (Abbildung 18).

Die Anzahl der Untersuchungsebenen auf die sich die Entzündung erstreckte war geringer im Vergleich zur Injektion von Vitamin-E-Selen und höher im Vergleich zur Injektion von isotonischer Kochsalzlösung. Die Entzündung war nicht auf die Umgebung unmittelbar an der Perforationsstelle beschränkt, sondern auf bis zu einem Viertel der Untersuchungsebene ausgedehnt und erstreckte sich in einer Länge von maximal ca. 15 mm über das perimysiale Fett- und Bindegewebe und das Endomysium der daran angrenzenden Muskulatur. Das Entzündungsbild in diesen Bereichen zeichnete sich sowohl nach der nadellosen Injektion als auch der Injektion mit Nadel durch eine massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten sowie eine ausgeprägte Fibrinexsudation und stellenweise Plasmaergüsse aus. In allen 6 Fällen traten Blutungen in Form von extravaskulären Erythrozyten auf. Stellenweise ergänzten Lymphozyten und Makrophagen das Entzündungsbild.

Bei einem Tier wurden nach der nadellosen Injektion in den Untersuchungsebenen 3P bis 5P keine Anzeichen einer Entzündung beobachtet und bei einem weiteren Tier keine bzw. geringgradige Entzündung in den Ebenen 4P und 5P. Nach der Injektion mit Nadel hingegen traten bei allen 3 Tieren mittel- bis hochgradige Entzündungen bis in die tiefen Ebenen 4P oder 5P auf.

Am Übergang zwischen Muskulatur und dem perimysialen Bindegewebe waren meist in der Nähe des Entzündungszentrums unabhängig von der Injektionsmethode ausgedehnte Hohlräume mit histiozytärer Ummantelung und einer maximalen Ausdehnung von 15 x 1 mm zu finden.

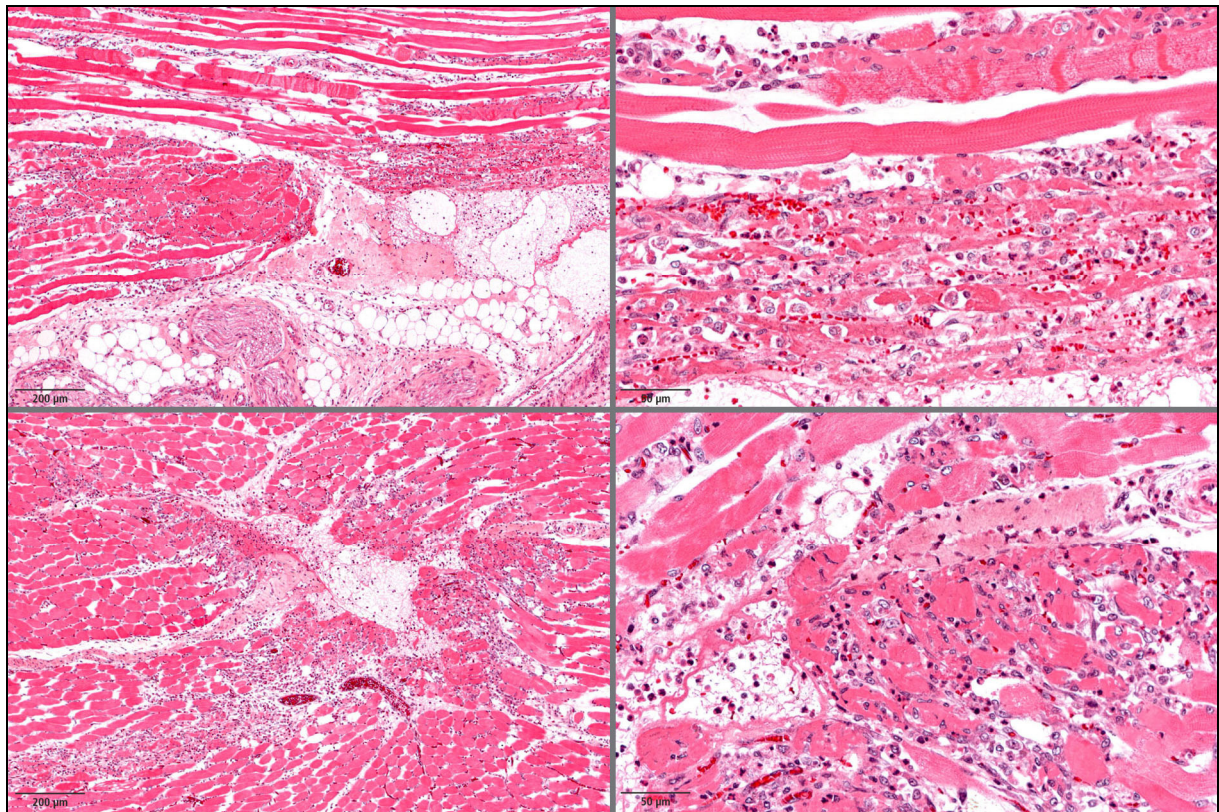


Abbildung 18 – Eisendextran Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion: Hgr. ausgedehnte Fibrininsudation und multiple Hohlräume innerhalb des perimysialen Fettgewebes mit mgr. Ansammlung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten; ggr. multifokale Einblutung; Muskelfasernekrosen im der angrenzenden Skelettmuskulatur mit begleitender resorptiver Entzündung unter Beteiligung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel: Mgr. herdförmige Fibrininsudation innerhalb des Endomysiums mit zentraler Hohlraumbildung und entzündlicher Infiltration durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen; Muskelfaseruntergang innerhalb der angrenzenden Muskulatur mit begleitender resorptiver Entzündung.

4.3.2.3.2 7 Tage nach der Injektion von Eisendextran

Die Perforationsstelle war in der Untersuchungsebene 1P bei einem von 3 Tieren nach Injektion mit Nadel sowie bei 2 von 3 Tieren nach der nadellosen Injektion erkennbar. Bei den übrigen 3 Tieren war die Perforationsstelle histologisch nicht eindeutig identifizierbar, auch wenn makroskopisch eine Rötung in der oberflächlichen Epidermis zu sehen war. In den folgenden Untersuchungsebenen 2P – 5P konnte die Perforationsstelle in mindestens einer Ebene bei allen 6 Tieren unabhängig von der Injektionsmethode identifiziert werden.

Bei einer injektionsbedingten Perforation der Muskulatur trat an dieser Stelle fokale eine hochgradige Muskeldegeneration auf. Diese war gekennzeichnet durch Reparationsversuche in Form von Muskelfasersprossung und teils ausgedehnte Fibrose mit dem Nachweis von kollagenen Fasern. Die Fibrose betraf teilweise ganze Muskelfaserbündel in einer Länge von maximal ca. 10 mm (Abbildung 19). Nur in seltenen Fällen waren direkt an der Perforationsstelle Lymphozyten zu finden. Eine gering- bis mittelgradige resorptive Entzündung mit der Einwanderung von Makrophagen konnte hier beobachtet werden. Zahlreiche Makrophagen waren mit braun pigmentierten Granula beladen.

Unabhängig vom Vorhandensein oder der räumlichen Nähe einer erkennbaren Perforationsstelle in der Muskulatur fanden sich im perimysialen Bindegewebe multifokal Herde mit Fibroblasten und Fibrozyten und kollagene Fasern. Zudem konnten mittelgradige lymphoplasmazelluläre Infiltrate und vereinzelt neutrophile Granulozyten und Makrophagen nachgewiesen werden, die teilweise bräunliche Pigmentgranula im Zellinneren enthielten. Darüber hinaus war das injizierte Eisenpräparat an einigen Stellen als bräunliche Verfärbung im Bindegewebe zu erkennen. Das perimysiale Fett- und Bindegewebe war zum Großteil in seiner Gesamtheit (maximal ca. 15 mm) von den Entzündungsmerkmalen überlagert. Vereinzelt waren Muskelareale von Muskelzelluntergang betroffen, die an Entzündungsgebiete im perimysialen Bindegewebe angrenzten.

Die Akkumulation von extravaskulären Erythrozyten und der Nachweis von Erythrophagozytose bei 2 von 3 Tieren nach der Injektion mit Nadel und bei 1 von 3 Tieren nach der nadellosen Injektion gaben Hinweise auf zurückliegende Einblutungen ins Gewebe.

Bei 7 Tage alten Entzündungen konnten unabhängig von der Injektionsmethode Hohlräume nachgewiesen werden, welche zu diesem Zeitpunkt eine Kapsel aus überwiegend Fibroblasten, Fibrozyten und wenigen Makrophagen in einer Längenausdehnung von maximal etwa 8 x 1 mm aufwiesen.

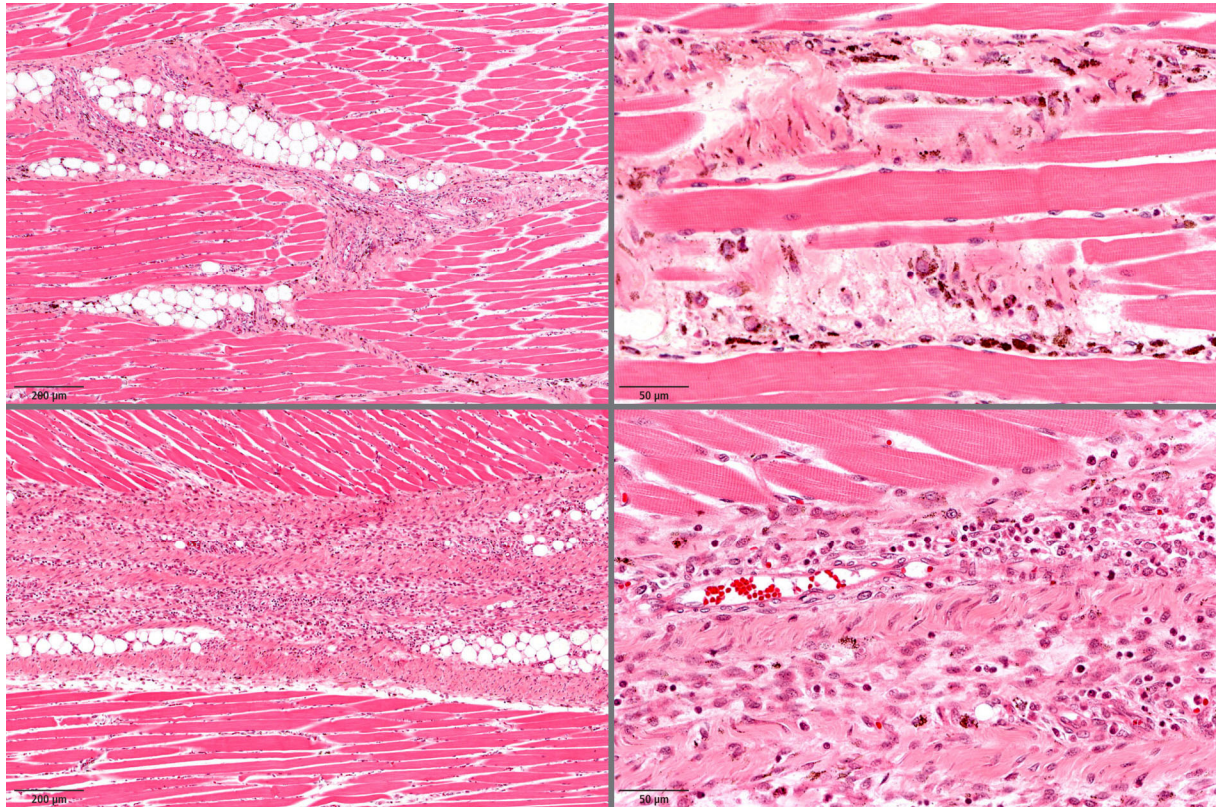


Abbildung 19 — Eisendextran Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion: Bandartige Fibrosierung, sich über das perimysiale Bindegewebe erstreckend, mit ggr. entzündlicher Infiltration unter Beteiligung von überwiegend Makrophagen mit braun pigmentierten Strukturen im Zellinneren, sowie einzelnen Lymphozyten; ggr. Muskelzelluntergang im Bereich der Fibrinexsudate und einzelne atrophische Fasern. Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: Großflächige, bandartig ausgedehnte perimysiale Fibrosierung mit mgr. Zellinfiltration unter Beteiligung von Lymphozyten und braunes Pigment enthaltenden Makrophagen.

4.3.2.3.3 Verteilung des Eisendextrans

Die Verteilung des Eisendextrans konnte mittels Turnbull-Färbung dargestellt werden und ist in Abbildung 20 zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Injektion und in Abbildung 21 7 Tage nach der Injektion zu sehen. Die Bereiche, in denen angefärbtes Eisen dunkelblau dargestellt war, deckten sich mit dem Verteilungsmuster der Entzündungszellen im perimysialen Bindegewebe. Neben einer Ausbreitung von angefärbtem Eisen frei im Bindegewebe, war auch phagozytiertes Eisen in Makrophagen erkennbar. In dieser Form war es auch in den regionären Lymphknoten zu finden.

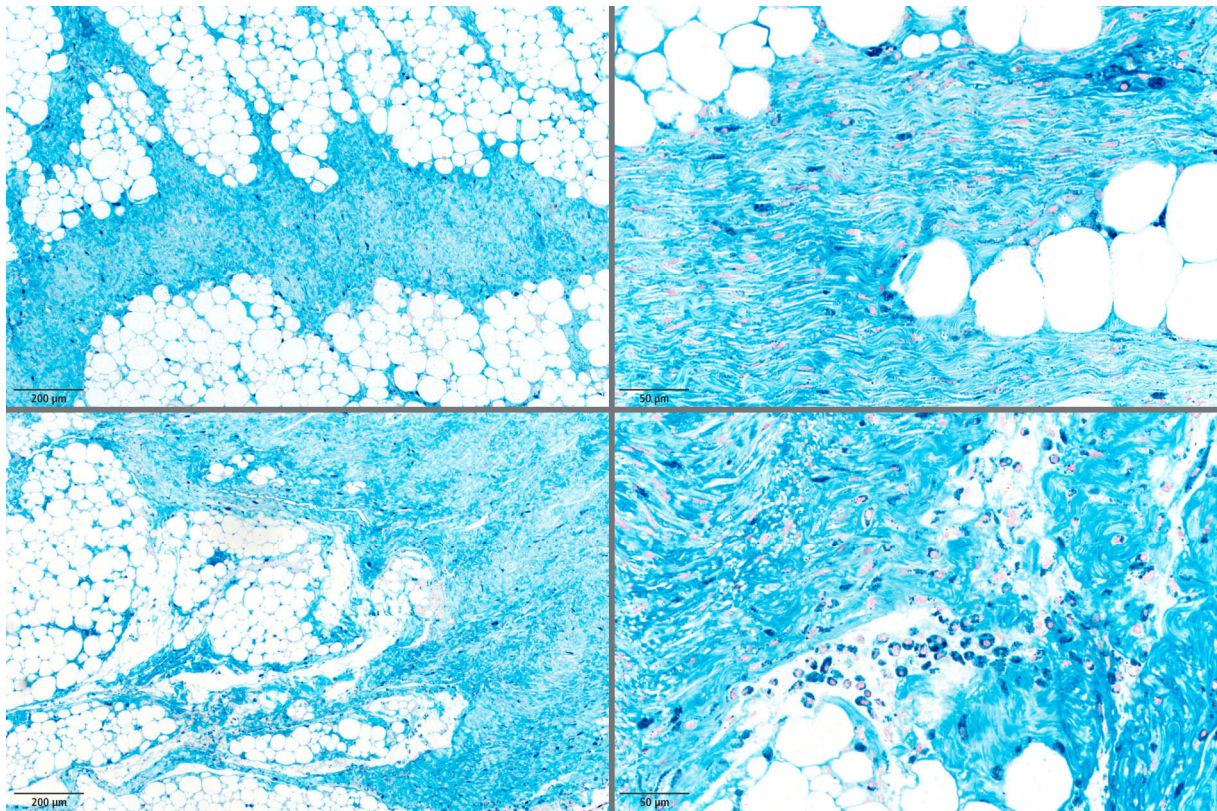


Abbildung 20 – Eisendextran Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion, Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel: In Spezialfärbung (Turnbull) Nachweis von Eisen innerhalb von Makrophagen.

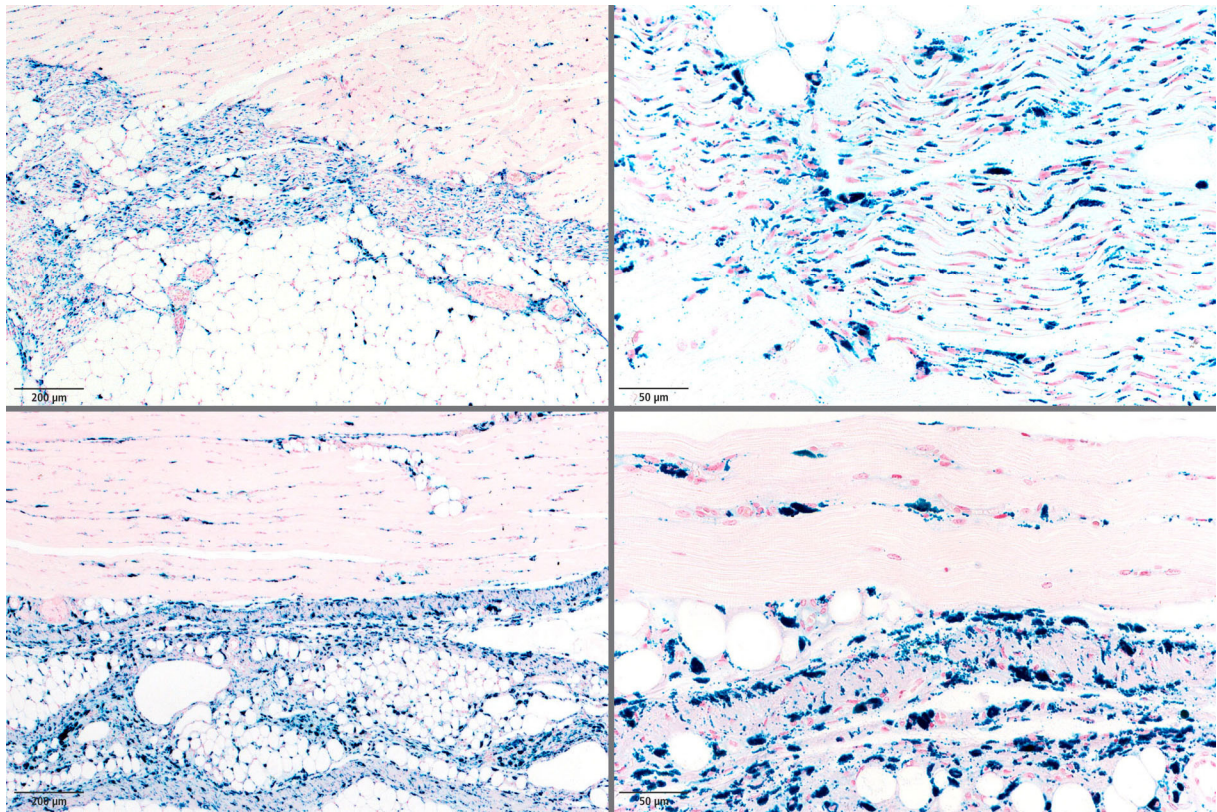


Abbildung 21 — Eisendextran Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion, Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: In Spezialfärbung (Turnbull) diffuser Eisennachweis im perimysialen Binde- und Fettgewebe, nur vereinzelt Makrophagen mit Eisen im Zellinneren.

4.4 Benutzerfreundlichkeit

4.4.1 Handhabung

Die Handhabung des *Pulse*[®] 250-Injektionsgerätes war leicht erlernbar. Die Vorbereitung für die Injektion dauerte länger als bei der Injektion mit Kanülenspritze, da die Dosiereinheit an den Kompressor angeschlossen werden musste und das Injektionshandstück mit der Dosiereinheit verbunden werden musste. Der Aufbau des Betriebsdruckes im Kompressor dauerte zusätzlich durchschnittlich 40 bis 50 Sekunden.

Die Positionierung der Injektionspistole gelang unproblematisch wenn der Kopf des Ferkels von einer Hilfsperson gut fixiert wurde. Die Injektion wurde durch Andrücken des Injektionskopfes an die Haut der Injektionsstelle ausgelöst und kann nur dann

optimal platziert werden, wenn das Tier mit dem Kopf nicht zur Seite hin ausweichen kann.

Bei einem Wechsel des Injektionspräparates mussten alle Leitungen und Düsen des *Pulse[®] 250* gründlich gereinigt werden. Die Zerlegung in seine Einzelteile und die komplette Reinigung aller Bestandteile nahm im Durchschnitt zwischen 25 und 35 Minuten in Anspruch und dauerte bei dem öligen Vitamin-E-Selen und der viskösen, farbintensiven Eisendextran-Lösung länger als nach dem Gebrauch von isotonischer Kochsalzlösung. Da der im System befindliche Anteil des Injektionspräparates bei der Reinigung verloren ging, waren in der Arzneimittelflasche nach der nadellosen Injektion stets 5 – 10 ml weniger Injektionslösung enthalten als nach der Injektion per Kanüle.

Bei der Injektion per Kanüle hingegen nahm die Vorbereitung und Reinigung wesentlich weniger Zeit in Anspruch. Dagegen war der Wechsel der Injektionskanüle ein zusätzlicher Aufwand im Vergleich zur nadellosen Injektion.

4.4.2 Lärmpegel

Bei Inbetriebnahme des Kompressors zum Aufbau des für die nadellose Injektion benötigten Betriebsdruckes entstand im Aufenthaltsbereich der Saugferkel ein erhöhter Lärmpegel. Dieser Vorgang dauerte ca. 40 – 50 Sekunden. In allen Bereichen des Stallabteiles wurde während diesem Zeitraum ein Lärmpegel von 65 db nicht überschritten. Während einer normalen Aktivitätsphase der Saugferkel lag der Lärmpegel in einem Bereich zwischen 45 und 55 db.

5 Diskussion

5.1 Verträglichkeit der nadellosen Injektion

Trotz ihrer intensiven Erforschung und Weiterentwicklung haben sich nadellose Injektionsgeräte gegenüber den herkömmlichen Injektionskanülen weder in humanmedizinischen noch in veterinärmedizinischen Bereichen durchgesetzt (SCHRAMM und MITRAGOTRI, 2002). Die Anforderungen an eine ideale Injektionsmethode, wie eine hohe Applikationssicherheit und gute Verträglichkeit werden von Kanülen hinreichend erfüllt und wurden laut verschiedenen Studien von der alternativen nadellosen Injektion noch nicht übertroffen (THEINTZ und SIZONENKO, 1991; SCHNEIDER et al., 1994; JACKSON et al., 2001; SIMON et al., 2011).

In der Humanmedizin trägt als Aspekt der Verträglichkeit auch die Akzeptanz der Patienten dazu bei, ob sich eine neue medizinische Methode durchsetzt (JACKSON et al., 2001). In der Humanmedizin hat nicht zuletzt die Gewöhnung der Patienten an die seit Jahrzehnten etablierte Kanüleninjektion Auswirkungen auf die gute Akzeptanz zugunsten dieser Methode. In der Veterinärmedizin hingegen spielt die Akzeptanz der Patienten eine sehr untergeordnete Rolle. Anders als in der Humanmedizin kann bei Tieren die Akzeptanz nicht evaluiert werden. Es kann lediglich die Verträglichkeit indirekt anhand von Messverfahren und Verhaltensbeobachtungen beurteilt werden, um damit Rückschlüsse auf das subjektive Empfinden bei einer nadellosen Injektion zu ziehen (VIÑUELA-FERNÁNDEZ et al., 2007). Dabei stützt man die Beobachtungen unter anderem auf Laborparameter, die Indizien für Stress und Schmerzen sind (SCHÖNREITER et al., 1999; PRUNIER et al., 2005; RAULT et al., 2011), und die Beobachtung der Lokalreaktion an der Injektionsstelle (HOUSER et al., 2004; IMSILP et al., 2005). Trotz der Möglichkeiten die sich bieten, die Verträglichkeit von Eingriffen am Tier zu beurteilen, sind bisher keine Studien bekannt, die sich mit dem schmerzbedingten Stress von Tieren im Zusammenhang mit nadellosen Injektionen auseinandersetzen.

Da die Empfindungen bei intramuskulären Injektionen aus der Humanmedizin hinreichend bekannt sind, da jeder Patient im Laufe seines Lebens mehrere Injektionen erhält, erübrigen sich Studien zur Schmerzempfindung von Tieren bei

denen diese humanmedizinischen Injektionsmethoden eingesetzt werden, weil man davon ausgehen kann, dass das Schmerzempfinden von Tieren in etwa dem unseren entspricht.

Eine neue Situation ergibt sich aber durch die Verwendung von tiermedizinischen Injektionsgeräten, die nicht in der Humanmedizin verwendet werden.

Nicht zuletzt hat vermutlich die fehlende gesetzliche Notwendigkeit zur Evaluierung der Verträglichkeit von tierärztlichen Injektionsgeräten dieser Art dazu beigetragen, dass umfassende Informationen zu diesem Thema fehlen. Gemäß § 2 Abs. 2 Nr. 1a AMG fallen tierärztliche Instrumente nur unter das Arzneimittelgesetz soweit sie zur einmaligen Anwendung bestimmt sind (PREUSS, 2012). Unter das Medizinproduktegesetz fallen wiederum nur Injektionsgeräte, die zum mehrmaligen Gebrauch am Menschen bestimmt sind (§3 Abs. 1 MPG).

5.1.1 Stress- und Schmerzreaktion

Insbesondere beim Vertrieb und bei der Vermarktung der nadellosen Injektionsgeräte wird hervorgehoben, dass die nadellose Injektion der konventionellen Injektionsmethode überlegen sei, da sie Schmerz und Stress bei den Tieren reduzieren soll (FIEBIG, 2009; SUS ONLINE, 2010; LEHNERT, 2011).

Der von MELLOR et al. (2000) geprägte Begriff von *schmerzbedingtem Stress* scheint für die folgende Studie besonders geeignet, da in diesem Fall eine Injektion den Stressor darstellt und zu erwarten ist, dass nicht nur der reine Injektionsschmerz sondern auch der Schreckmoment als psychische Komponente die messbare Cortisolreaktion maßgeblich beeinflussen wird. Gerade der Einfluss dieses Faktors ist für die Beurteilung der Verträglichkeit von Nutzen (CHROUSOS, 2009).

Gemessen am Verlauf der Cortisolkonzentration kann in diesem Versuch kein reduzierter schmerzbedingter Stress bei nadellos behandelten Tieren festgestellt werden. Die nadellose Injektionsmethode ist der konventionellen hinsichtlich des ausgelösten Cortisol-Anstieges statistisch weder über- noch unterlegen, wenn man die Versuchsgruppe der 14 Tage alten Saugferkel betrachtet. Die Amplitude und die Fläche unter der Cortisolverlaufskurve sind zwar bei den Tieren nach einer Kanüleninjektion tendenziell geringer als nach der nadellosen Injektion, allerdings ist dieser Unterschied nicht signifikant.

Die Amplitude der Cortisolverlaufskurve nach der nadellosen Injektion ist hingegen bei Saugferkeln am 3. Lebenstag signifikant höher als bei Saugferkeln am 14. Lebenstag nach Applikation desselben Präparates (Eisendextran). Dies könnte durch den Gewichtsunterschied der Versuchstiere (1,7 – 1,9 kg am 3. Lebenstag und 4,1 – 5,0 kg am 14. Lebenstag) erklärt werden und dem daraus resultierenden unterschiedlichen Injektionsvolumen relativ zur Körpermasse. Bei den älteren Saugferkeln macht ein Injektionsvolumen von 2 ml nur 0,04 – 0,05% in Relation zur Körpermasse aus, während es bei den jüngeren Tieren mit 0,11% immerhin die doppelte relative Menge ist.

Außerdem geht man von einer höheren Sensitivität gegenüber Schmerz bei Neonaten jeder Spezies aus (CHROUSOS, 2009; ERHARDT und HENKE, 2011).

Dies erklärt jedoch noch nicht ausreichend die signifikant höhere Cortisolkonzentration nach der nadellosen Injektion im Vergleich zur Injektion mit Nadel. Denn die Cortisolkonzentrationen nach der Kanüleninjektion unterscheiden sich bei Saugferkeln am 3. Lebenstag trotz des Altersunterschiedes nicht signifikant von denen der Saugferkel am 14. Lebenstag nach beiden Injektionsmethoden.

Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass sich Tiere mit erhöhter Schmerzempfindlichkeit in der Gruppe befinden, die eine nadellose Injektion erhalten hatte, da die Werte in dieser Gruppe stärker streuen als in der Vergleichsgruppe.

Nach WEAVER et al. (2000) durchleben Ferkel in den ersten 3 Lebenswochen eine sensible Phase der postnatalen Ontogenese der HPA-Achse. Sie ist geprägt durch die Ausbildung von Rezeptoren und Katalysatoren des Cortisol-Metabolismus. Sie reagieren in dieser Phase hochempfindlich auf Stressoren, je nach der Intensität von störenden Umwelteinflüssen und Manipulationen, denen die neugeborenen Ferkel in den ersten Lebenswochen ausgesetzt sind. In Abhängigkeit vom Verlauf dieser Phase wird die spätere Stresstoleranz unterschiedlich stark ausgeprägt. Auch die basalen Cortisolspiegel sind in dieser Entwicklungsphase generell höher. Ferkel mit höheren Basalkonzentrationen reagieren mit einem höheren Anstieg der Cortisolkonzentrationen auf eine Ausschüttung des Stress-hormons ACTH. Selbst der Stress des Muttertieres vor der Geburt hat einen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Ferkel hinsichtlich ihrer Stressreaktion (OTTEN et al., 2001; KANITZ et al., 2003). In diesem Zusammenhang ist die Bindungskapazität bestimmter Glucocorticoid-Rezeptoren von besonderer Bedeutung. Diese Bindungs-kapazität

nimmt in der empfindlichen postnatalen Periode von Schweinen erst nach Auseinandersetzung mit Stressreaktionen zu. Nur wenn die Rezeptoren in diesem Sinne ausreichend entwickelt sind, kann es nach der Bindung von Glucocorticoiden an diese Rezeptoren zu einem negativen Rückkopplungsmechanismus kommen, durch den die weitere Ausschüttung des Stresshormons Cortisol unterdrückt wird und damit die Homöostase im Organismus erhalten wird (MEANEY et al., 1989; KANITZ et al., 2011).

Die basalen Cortisolkonzentrationen können in der Saugferkelphase bei Altersunterschieden von wenigen Tagen um 20 nmol/l schwanken, wobei sie postnatal am höchsten sind (OTTEN et al., 2001; KANITZ et al., 2011). Der Anstieg der Cortisolkonzentration nach experimenteller ACTH-Stimulation fällt ebenfalls bei 3 Tage alten Saugferkeln signifikant höher aus als bei Saugferkeln kurz vor dem Absetzen (KANITZ et al., 2003; 2011). Die Unterschiede bei den mittleren Basalkonzentrationen bei 14 und 3 Tage alten Saugferkeln können hierauf zurückgeführt werden. Auch die starke Streuung der mittleren Maximalwerte bei Saugferkeln am 3. Lebenstag kann durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Stressoren bei Neonaten bedingt sein (CHROUSOS, 2009).

Warum dies nur für die nadellos behandelte Gruppe zutrifft, ist unter Umständen durch die zufällige Auswahl der Versuchstiere zu erklären.

Entscheidend ist, dass bei allen Altersgruppen, sowohl am 3. Lebenstag als auch am 14. Lebenstag, die Cortisolkonzentration bei der nadellos behandelten Gruppe nach der Injektion höher war als bei der mit Nadel behandelten Vergleichsgruppe. Zwar war dieser Unterschied bei 14 Tage alten Saugferkeln nicht signifikant, aber in diesem Fall muss in wiederholten Versuchen geprüft werden, ob dieser Verlauf reproduzierbar ist und ob sich eine Signifikanz bei einer Erhöhung der Tierzahl pro Versuchsgruppe einstellt. Sofern anhand der Cortisolwerte keine Unterschiede in der Stressreaktion festzustellen sind kann auch die zusätzliche Messung weiterer Parameter, die Stress und Schmerzempfinden widerspiegeln Aufschluss geben und eine umfassendere Aussage über die Verträglichkeit ermöglichen (JENSEN et al., 1996).

Bei der Interpretation der Stressreaktion anhand einer Cortisol-Verlaufskurve ist des Weiteren noch zu beachten, dass außer der Injektion noch weitere Faktoren zu einem Anstieg der Cortisolkonzentration im Serum führen. Als wichtigster Faktor ist

hierbei das Handling der Tiere zu berücksichtigen. Insbesondere die Fixierung der Tiere zur Blutabnahme löst eine Stressreaktion aus. MERLOT et al. (2011) konnten zeigen, dass eine 2 Minuten andauernde Fixierung von Sauen zur Blutabnahme aus der V. cava cranialis einen signifikanten Anstieg der Serumcortisolkonzentration bewirkt.

Bei der vorliegenden Auswertung sind jedoch im Wesentlichen die Unterschiede der gemessenen Cortisolwerte zwischen den Vergleichsgruppen für das Untersuchungsziel relevant. Nicht der absolute Anstieg der Cortisolkonzentration im Vergleich zum Basalwert dient zur Beurteilung der Verträglichkeit, sondern der relative Unterschied der Maximalwerte zwischen den Versuchsgruppen. Da bei allen Versuchsgruppen Handling und Fixierungsmaßnahmen identisch sind, haben diese keine Auswirkungen auf den relativen Unterschied der Werte zwischen den Gruppen. Allerdings sind aus eben diesen Gründen die Versuchsergebnisse nicht geeignet, die Belastung, die durch eine Injektion entsteht, in Form von absoluten Werten zu quantifizieren. Es kann lediglich gezeigt werden, dass die nadellose Injektion mit dem *Pulse® 250* eine höhere Stressbelastung für die Versuchstiere in Relation zur Injektion mit Nadel darstellt.

5.1.2 Untersuchung der Lokalreaktion

5.1.2.1 Tiefe der Entzündungsreaktion

Die Auswertung der Lokalreaktion nach der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle lässt in dieser Studie die Tendenz erkennen, dass die nadellose Injektion eine stärkere Reaktion hervorruft, als die Injektion mit Nadel. Umfangsvermehrungen, Verfärbungen und Verhärtungen an der Injektionsstelle treten nach der nadellosen Injektion signifikant häufiger auf als nach der Injektion mit Nadel. Auch die maximale Ausprägung von Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung ist nach der nadellosen Injektion von Vitamin-E-Selen und Eisendextran stärker als nach der Injektion mit Nadel. Dies lässt vermuten, dass eine nadellose Injektion entweder tatsächlich eine stärkere Gewebereaktion hervorruft oder, dass es nur so erscheint, da die Reaktion sich unmittelbar unter der Haut und in den oberflächlichen Muskelschichten abspielt, während die Reaktion sich bei der Injektion mit Nadel in der Tiefe abspielt, wo sie bei der klinischen Untersuchung weder adspektorisch noch

palpatorisch auffällig ist. An dieser Stelle muss bei der Auswertung der Lokalreaktion hinterfragt werden, bis zu welcher Tiefe eine Lokalreaktion dieser Form und Intensität noch bei der klinischen Untersuchung äußerlich erfasst werden kann. Die tiefste Untersuchungsebene befindet sich in einem Abstand von ca. 36 – 45 mm von der Hautoberfläche entfernt, wobei die Injektionstiefe bei der Injektion mit Nadel der Kanülenlänge von 25 mm entspricht. Dass Injektionen trotzdem als schmerzhaft empfunden werden können, auch wenn äußerlich sichtbare Anzeichen einer Entzündung fehlen, zeigen BENNETT et al. (1998) in ihrer Studie.

Um zu überprüfen, ob die nadellose Injektion tatsächlich eine stärkere Entzündungsreaktion hervorruft, werden die Ergebnisse der histologischen Untersuchung mit denen der klinischen Untersuchung der Lokalreaktion verglichen.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der klinischen Untersuchung der Lokalreaktion sind bei der histologischen Auswertung der einzelnen Untersuchungsebenen weder hinsichtlich der Ausprägung der Entzündung noch des Entzündungstypes in Abhängigkeit vom Injektionsverfahren Unterschiede ersichtlich. Daraufhin wurde die Tiefe der Lokalreaktion und deren Verteilung auf die unterschiedlichen Untersuchungsebenen nach der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel verglichen.

Bei etwa der Hälfte der Tiere ist zu erkennen, dass nach der nadellosen Injektion mittel- bis hochgradige Entzündungsvorgänge eher in den oberflächlichen Untersuchungsebenen auftreten und nach der Injektion mit Nadel vermehrt in den tieferen Untersuchungsebenen. Die Verteilung der Entzündungsreaktion ist der Tabelle 25 zu entnehmen. Diese Verteilung stimmt mit den Befunden bei der makroskopischen Untersuchung der quergeschnittenen Nackenmuskulatur nach der Injektion von Eisen überein. Hier war nach der nadellosen Injektion ein größerer Teil des subkutanen Fettgewebes durch das Eisendextran-Präparat braun verfärbt als nach der Injektion mit Nadel.

Dagegen ist bei der anderen Hälfte der Tiere, überwiegend diejenigen die eine Injektion mit Nadel erhalten hatten, diese Tendenz nicht ausgeprägt. Stattdessen ist insbesondere mit steigender Viskosität der Injektionspräparate eine mittel- bis hochgradige Entzündung in gleichmäßig starker Ausprägung über alle Untersuchungsebenen verteilt. Bei 5 Tieren ist das Verhältnis sogar umgekehrt. Das bedeutet, dass die Entzündung in diesen Fällen nach der nadellosen Injektion auf die

tiefen Ebenen und nach der Injektion mit Nadel auf die oberflächlichen Ebenen konzentriert ist.

Die größere Häufigkeit und stärkere Ausprägung der klinisch untersuchten Lokalreaktionen nach der nadellosen Injektion sind also nicht nur durch eine oberflächlichere Lokalisation der Entzündung im Vergleich zur Injektion mit Nadel bedingt.

Dass die Befunde der klinischen Untersuchung dennoch nicht eindeutig durch die Auswertung der Entzündungsreaktion auf histologischer Ebene bestätigt werden, kann dadurch erklärt werden, dass die begrenzten Untersuchungsebenen nur einen zentralen Ausschnitt der gesamten Lokalreaktion darstellen. Daher ist unbekannt, wie weit sich die Entzündungsreaktion über die Ränder der Untersuchungsebene hinaus erstreckt. Eine technische Bearbeitung von größeren Ausschnitten zur histologischen Untersuchung lässt sich mit den verwendeten Methoden jedoch nicht realisieren.

5.1.2.2 Entzündung und Muskelzelluntergang

Eine Zerstörung von Muskelgewebe tritt bei beiden Injektionsverfahren gleichermaßen auf. Auch die räumliche Trennung von Perforationsstelle in der Muskulatur und Ausdehnung der Entzündung im perimysialen Bindegewebe ist bei beiden Injektionsverfahren gegeben. Die Perforationsstellen in der Muskulatur selbst und die damit einhergehende Fibrosierung und Infiltration mit Entzündungszellen ist in beiden Fällen lokal begrenzt. Die Entzündungsvorgänge im perimysialen Fettgewebe sind weniger in Zusammenhang mit der Perforationsstelle zu bringen, da diese in den meisten Fällen räumlich getrennt voneinander auftreten, außer wenn sich die Perforationsstelle direkt im Bindegewebe und nicht in der Muskulatur befindet. Diese Entzündung im perimysialen Bindegewebe ist daher auf die entzündlichen Eigenschaften des verwendeten Injektionspräparates, und nicht auf den Injektionsvorgang an sich zurückzuführen. Je höher die Viskosität des Arzneimittels, desto stärker ist die Entzündung ausgeprägt. Diese Tendenz stimmt mit den Befunden bei der klinischen Untersuchung der Lokalreaktion überein. Demnach ist die Anzahl der Tiere mit höhergradigen Umfangsvermehrungen, Verhärtungen und Verfärbungen der Injektionsstelle nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung geringer als nach der Injektion von Eisendextran und

Vitamin-E-Selen. Dies könnte zu der Annahme führen, dass bei einer Injektion von stark viskösen Arzneimitteln das Gewebe stärker geschädigt wird. Bereits SCHLOESSER et al. (2008) berichten von Unterschieden bei der nadellosen Injektion in Abhängigkeit von der Viskosität des Injektionspräparates. Wahrscheinlicher ist jedoch der Einfluss von Lösungsvermittlern und sonstigen Bestandteilen in den verwendeten Arzneimitteln, die unterschiedlich stark gewebereizend wirken, ein Aspekt der auch von CHAVEZ MORENO und BICKHARDT (1997) untersucht wurde. Dieser Zusammenhang wird anhand der mittels Turnbull gefärbten histologischen Präparate erkennbar, da sich die Zentren der Ausbreitung des Eisenpräparates mit den Gebieten der höchsten Entzündungszelldichte decken. Diese Gebiete sind vornehmlich auf das perimysiale Bindegewebe und die angrenzende Muskulatur beschränkt. An der Perforationsstelle selbst treten nur vereinzelt Makrophagen mit internalisiertem Eisen auf. Diese Beobachtung führt zu dem Schluss, dass das Injektionspräparat sich in den bindegewebigen Räumen zwischen den Muskelfaserbündeln in der Peripherie der eigentlichen Injektionsstelle verteilt und eine separate Entzündungsreaktion hervorruft.

5.1.2.3 Entzündung aufgrund Fremdkontamination

Bei der nadellosen Injektion kann auch die Beteiligung von entzündlichen Substanzen, die bei der Injektion in die Tiefe des Gewebes befördert werden, nicht ausgeschlossen werden. Zur Herstellung des benötigten Betriebsdruckes für die Injektion wird durch den Kompressor die Umgebungsluft umgesetzt. Es ist technisch nicht auszuschließen, dass die Stallluft beim Injektionsvorgang mit injiziert wird und deren Bestandteile die Entzündungsreaktion beeinflussen. Bereits RAY et al. (2010) berichten, dass bei der nadellosen Injektion vermehrt Oberflächenkeime, die sich auf der Haut befinden, in die Tiefe der Muskelschichten transferiert werden können, was bei Injektionen mit Nadeln in sehr viel geringerem Maße der Fall ist.

Bei der Beurteilung von Entzündungsreaktionen zur Bewertung der Verträglichkeit eines Injektionsverfahrens sollten jedoch zwei Aspekte berücksichtigt werden. Zum einen verursacht die Entzündungsreaktion an einer Injektionsstelle Schmerzen (BENNETT et al., 1998). Zum anderen sollte jedoch beachtet werden, dass die Entzündungsreaktion essentiell für die Resorption des applizierten Präparates ist

(VANNIER und CARIOLET, 1991). Das Auftreten einer ausgeprägten Entzündungsreaktion allein darf also die Injektionsmethode nicht zwangsläufig abwerten.

5.1.3 Gewebeläsionen

Über die Aussagekraft der CK speziell bei jungen Saugferkeln gibt es nur wenige Untersuchungen. Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen ergeben die Untersuchungen von BOSTEDT und REINHARDT (1980), dass die Aktivität der CK erst nach der ersten Lebenswoche im Bereich adulter Tiere liegt. Für die 3 Tage alten Saugferkel trifft dies nicht zu, was durch die geringeren Werte der mittleren CK-Konzentration im gesamten Messzeitraum zum Ausdruck kommt. Auch bei der Amplitude und bei der Dauer bis zum Erreichen der Maximalkonzentration sind demnach entsprechende altersbedingte Unterschiede zu erwarten. Der Vergleich von mehreren Untersuchungen zur stressinduzierten CK-Aktivität von Schweinen bei unterschiedlichen Altersgruppen ergibt, dass die Dauer bis zum maximalen Anstieg der CK-Aktivität im Serum nach einer Belastung positiv mit dem Alter der Schweine korreliert (BICKHARDT und SCHWABENBAUER, 1981; KRUFF und FRAHM, 1984; GROCHOLL und BICKHARDT, 1988; CHAVEZ MORENO und BICKHARDT, 1997). Obwohl für Saugferkel im Alter der verwendeten Versuchstiere an keiner Stelle konkrete Referenzwerte für den zeitlichen Verlauf des CK-Anstieges nach Belastung angegeben werden, gibt die zusammenfassende Betrachtung dieser Untersuchungen Hinweise darauf, dass bei Saugferkeln die CK-Aktivität im Serum in einem Zeitraum von 4 bis 8 Stunden nach der Einwirkung von Myostress bereits wieder nachlassen könnte.

Ebenso sind Schwankungen der CK-Aktivität in Abhängigkeit von der Rasse mit zu berücksichtigen. Daher ist es kaum möglich, Basalwerte zu definieren und einen relevanten Effekt festzulegen, der darüber entscheidet, ab welcher Erhöhung der CK-Aktivität vom Basalwert tatsächlich eine Abweichung von der Norm vorliegt (HEINRITZI, 2006b; KRAFT, 2006b). Bei den verwendeten Versuchstieren kann von einer einheitlichen CK-Aktivität ausgegangen werden, da sie aus derselben Zuchtlinie stammen.

Die im Verlauf des Versuches erhobenen mittleren CK-Werte liegen im Bereich der Referenzwerte und lassen keine injektionsbedingte Schädigung des Muskelgewebes erkennen. CHAVEZ MORENO und BICKHARDT (1997) beschrieben bei ihren

Injektionsversuchen einen Zusammenhang zwischen dem maximalen CK-Anstieg im Serum und dem Ausmaß der durch die Medikamentenapplikation hervorgerufenen Muskelschädigungen. Das Ausmaß der Muskelfaserzerstörung bestimmt dabei die freigesetzte Menge von muskelspezifischen Enzymen, wie der CK. Im durchgeführten Versuch ist an der Injektionsstelle bei der histologischen Untersuchung Muskelzelluntergang unterschiedlichen Ausmaßes zu sehen. Bei beiden Injektionsarten können die Perforationsstellen der Nadel bzw. des Injektionsstrahles in Form von fokal begrenzten Arealen mit Muskelzelluntergang erkannt werden. Diese reichen bis in die tiefsten Untersuchungsebenen (P5). Dies zeigt, dass sowohl die nadellose als auch die Injektion mit Nadel die Muskulatur punktuell an der Injektionsstelle zerstört. Zusätzlich treten separat von der Perforationsstelle auch in deren Peripherie gelegentlich Bereiche mit geschädigten Muskelzellen auf. Diese Bereiche umfassen randständige Muskelbezirke, die direkt an massiv entzündlich infiltrierte Bindegewebe grenzen. Der CK-Gehalt, der aus den durch die Injektion zerstörten Muskelfasern austritt, führt im vorliegenden Fall jedoch nicht zu einem von der Norm abweichenden Anstieg der CK-Aktivität im Blut. Da die mittleren CK-Konzentrationen in allen Versuchsgruppen innerhalb der Referenzbereiche liegen, hat die Ermittlung eines CK/AST-Quotient keine Aussagekraft.

5.2 Zuverlässigkeit der nadellosen Injektion

5.2.1 Verteilungsmuster

Bei der Vermarktung von nadellosen Injektionsgeräten wird stets eine verbesserte Verteilung im Gewebe im Vergleich zur konventionellen Injektion hervorgehoben (LEHNERT, 2011; PULSE NEEDLEFREE SYSTEMS, 2012). In nicht studienbasierten, journalistischen Artikeln wird häufig dargestellt, dass bei einer Injektion mit Nadel an deren Spitze blasige Hohlräume mit dem Ausmaß des Injektionsvolumens entstehen, wohingegen eine nadellose Injektion die Lösung netzartig im Gewebe verteilt (WALD, 2010; PULSE NEEDLEFREE SYSTEMS, 2012).

Dieser Behauptung steht die Aussage einiger Autoren gegenüber, die ein identisches Verteilungsmuster des Injektionspräparates bei der Injektion mit Nadel und der nadellosen Injektion beschreiben (WAGNER et al., 2004; PRAESTMARK JUUL et

al., 2012). Demnach folgt die Injektionslösung unabhängig von der Injektionsmethode dem Weg des geringsten Widerstandes, entlang von Leitstrukturen wie Bindegewebsfasern im subkutanen Fettgewebe und Haarschäften (BENNETT et al., 1971; ELGENEIDY et al., 1974). Zu diesem Ergebnis kommen auch WAGNER et. al. (2004) in ihrer Studie an isolierten Schlachtkörperteilen von Schweinen. Die Verteilung von 0,1 ml einer Farbindikator-Lösung, die mit dem nadellosen Injektionsgerät *INJEX*[®] appliziert wurde, verläuft ebenso wie bei der Injektion mit Nadel entlang von Bindegewebsfasern im subkutanen Fettgewebe und von Haarschäften. Die typischerweise angenommene Bildung von Kavernen unter Verdrängung oder Zerreißung des Gewebes bei der Injektion mit Nadel wird in keiner dieser Studien bestätigt.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen stimmen mit den Beobachtungen dieser Studien überein. Das Verteilungsmuster des applizierten Eisendextrans ist bei den Transversalschnitten aus der Nackenmuskulatur bereits makroskopisch zu erkennen. Die dem Eisenpräparat entsprechende dunkelbraune Färbung des Gewebes überwiegt auf der Körperhälfte, auf der die Injektion stattgefunden hat. Sie ist in diesem Bereich großflächig auf das lockere Bindegewebe zwischen den Muskelbäuchen verteilt und strahlt auf die randständigen Muskelbezirke aus. Ein flüssigkeitsgefüllter Hohlraum mit Gewebeverdrängung ist bei keinem Tier vorhanden. Diese Befunde beziehen sich auf beide Injektionsmethoden.

Aus diesen makroskopischen Befunden nach der Injektion von Eisendextran kann bereits abgeleitet werden, dass die vom Hersteller angegebene Druckeinstellung für Saugferkel unter 5 kg (2,4 bar) und Injektionslösungen höherer Viskosität (Erhöhung des Injektionsdruckes um 0,3 – 0,7 bar, hier: 0,6 bar) geeignet ist, das Injektionspräparat intramuskulär zu platzieren.

Die Betrachtung des Verteilungsmusters auf histologischer Ebene liefert ergänzende Informationen, die ebenfalls mit den Beobachtungen der oben genannten Studien übereinstimmen. Die Verteilung des injizierten Eisenpräparates kann mittels der Färbetechnik nach Turnbull sichtbar gemacht werden. Dabei fällt auf, dass die Verteilung des nadellos applizierten Eisendextrans im Gewebe wiederum vornehmlich entlang den Leitstrukturen erfolgt. Die Injektionslösung nimmt auch hier den Weg des geringsten Widerstandes, das heißt entlang des lockeren

Bindegewebes zwischen den Muskelbäuchen. Dies trifft auf alle Untersuchungsebenen zu, in denen das angefärbte Eisen gleichermaßen verteilt ist. Nach der Injektion per Kanüle kann ein ebensolches Verteilungsmuster beobachtet werden. Auch hier ist die Anreicherung des Eisens im perimysialen Bindegewebe sichtbar. Es gibt weder Hinweise auf die Entstehung von Eisen enthaltenden blasigen Hohlräume mit dem Ausmaß des Injektionsvolumens, noch auf dadurch bedingte Gewebeerreißungen. Die in der durchgeführten Untersuchung beobachteten Hohlräume sind vielmehr enge Spalten an den Grenzflächen zwischen Muskelgewebe und perimysialen Bindegewebe und sind auf eine maximale Ausdehnung von durchschnittlich 10 x 3 mm beschränkt. Diese können gleichermaßen nach der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel und zu beiden Injektionszeitpunkten (24 Stunden und 7 Tage vor Euthanasie) beobachtet werden. Bei 24 Stunden alten Injektionsstellen sind diese Hohlräume nicht zellulär abgekapselt, während sie bei 7 Tage alten Injektionsstellen überwiegend von Fibroblasten, Fibrozyten und teilweise Makrophagen abgegrenzt werden. Dies spricht dafür, dass ihre Entstehung auf den Injektionsvorgang zurückzuführen ist. Eine Anreicherung von Eisen in diesen Hohlräumen kann jedoch nicht beobachtet werden, was die Frage nach deren Entstehungsursache aufwirft. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich dabei um ein Artefakt, bei dem der Inhalt dieser Hohlräume durch die technische Bearbeitung und Färbung des Gewebes zur Herstellung von histologischen Präparaten ausgewaschen wird.

5.2.2 Pharmakokinetik

Erkenntnisse über Unterschiede in der Pharmakokinetik von nadellos und per Kanüle applizierten Arzneimitteln können im Rahmen des Versuches nur bei der Injektion von Eisendextran anhand des Konzentrationsverlaufes von Eisen im Blut sowie dem histologisch erkennbaren Verteilungsmuster gewonnen werden.

5.2.2.1 Eisenkonzentration im Blut

Die im Blut gemessene Eisenkonzentration entspricht grundsätzlich etwa drei Vierteln des Eisengehaltes im Körper (KRAFT, 2006a) und umfasst als freier Eisenanteil nicht den als Speichereisen und Transporteisen gebundenen Anteil. Bei den Versuchsgruppen der Saugferkel am 3. Lebenstag liegen die Basalwerte der

Eisenkonzentration im Serum mit 8,8 $\mu\text{mol/l}$ (Gruppe 1) und 9,4 $\mu\text{mol/l}$ (Gruppe 2) deutlich unter den physiologischen Grenzwerten von 16 $\mu\text{mol/dl}$ (BOLLWAHN et al., 1983) bzw. 21 $\mu\text{mol/l}$ (HEINRITZI, 2006a). Bei den Versuchstieren, die diese Grenzwerte unterschreiten, liegt demnach bereits ein latenter Eisenmangel vor. Dieser ist in beiden Gruppen, unabhängig von der Injektionsmethode, bereits 30 Minuten nach der Applikation von Eisendextran behoben und der Grenzwert wird in der vorliegenden Untersuchung bis zum Zeitpunkt des Absetzens nicht mehr unterschritten.

Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass den Saugferkeln bereits nach der ersten Lebenswoche Prestarter-Futter angeboten wird. Die Eisenkonzentration ist daher ab der zweiten bis dritten Lebenswoche nicht ausschließlich auf das verabreichte Eisendextran zurückzuführen, sondern wird zusätzlich von der Aufnahme eisenhaltigen Futters beeinflusst. Insbesondere zum Zeitpunkt der Blutabnahme am 28. Tag nach der Injektion befanden sich die Ferkel bereits 1 – 3 Tage im Flatdeck und nahmen zu diesem Zeitpunkt ausschließlich Aufzuchtfutter auf. Dies könnte den Anstieg der Eisenkonzentration zum Zeitpunkt der letzten Messung erklären.

Die Ergebnisse zeigen, dass die nadellose Injektion ebenso wie die herkömmliche Injektion mit Nadel geeignet erscheint, um einer Eisenmangelanämie bei Saugferkeln vorzubeugen, wenn das Eisendextran-Präparat gemäß der für die konventionelle Injektion geltenden Dosierungsvorschriften eingesetzt wird. Dennoch muss beachtet werden, dass die Eisenkonzentration im Blut der Saugferkel nach der konventionellen Kanüleninjektion bis über einen Zeitraum von 3 Wochen signifikant höher ist, als nach einer nadellosen Injektion derselben Injektionsmenge. Da die Aufnahme von Eisen über die Nahrung nicht berücksichtigt ist und die Fläche unter der Kurve nicht berechnet wurde, kann in dieser Arbeit nicht von der Bioverfügbarkeit des Eisenpräparates gesprochen werden.

Hinsichtlich der Bioverfügbarkeit gibt es aber Ergebnisse aus Arbeiten von APLEY (2007), wonach die Bioverfügbarkeit eines Arzneimittels bei der Injektion mit Nadel höher ist als bei der nadellosen Injektion. Eine schnellere Resorption des nadellos applizierten Arzneimittels im Vergleich zur Injektion mit Nadel und ein damit verbundenes früheres Erreichen der maximalen Konzentrationen im Blut wie bei

BENNETT (1998) und SCHNEIDER (1994) können in der durchgeführten Studie nicht beobachtet werden.

Im durchgeführten Versuch ist der Konzentrationsunterschied des Eisens im Blut der Ferkel irrelevant in Bezug auf die Wirksamkeit des Medikaments, da auch nach der nadellosen Injektion die verfügbare Wirkstoffmenge ausreicht, um über den gesamten Zeitraum der Saugferkelphase einer Eisenmangelanämie vorzubeugen. Dennoch kann der Konzentrationsunterschied relevant sein, wenn durch den Anteil des von der Haut abprallenden und aus der Injektionsstelle zurückfließenden Arzneimittels die gewünschte Wirkstoffkonzentration nicht mehr erreicht wird. Auch die verstärkte Anreicherung im subkutanen Fettgewebe nach der nadellosen Injektion kann das Resorptionsverhalten des Arzneimittels beeinflussen (FREY, 2009). Insbesondere bei geringen Injektionsvolumina besteht die Gefahr, dass gewünschte Wirkstoffkonzentrationen nicht mehr erreicht werden, da der bei der nadellosen Injektion auftretende relative Dosisverlust gemäß SCHLOESSER et al. (2008) mit sinkendem Injektionsvolumen linear zunimmt. Ob beim Einsatz des Pulse[®] 250 tatsächlich eine reduzierte Bioverfügbarkeit nach der nadellosen Injektion im Vergleich zur konventionellen Injektionsmethode besteht, müsste, unter anderem unter Berücksichtigung des mit der Nahrung aufgenommenen Futters und der Berechnung der Fläche unter der Konzentrationskurve, geprüft werden. Aus den signifikant höheren Eisenkonzentrationen im Serum nach der konventionellen Injektion mit Nadel im Zeitraum von bis zu 4 Stunden nach der Injektion, in dem der mit der Muttermilch aufgenommene Eisengehalt vernachlässigt werden kann, kann man jedoch folgern, dass die tatsächlich in den Kreislauf gelangende Eisenkonzentration nach der nadellosen Injektion wesentlich geringer ist.

Es ist außerdem zu beachten, dass die im Rahmen der Zulassungsverfahren ermittelten Dosierungsvorschriften von Arzneimitteln zur intramuskulären Injektion nur für die Injektion mit Nadel geprüft werden. Von den Herstellern der Arzneimittel ist eine nadellose Injektion bisher nicht vorgesehen.

5.2.2.2 Intramuskuläre Anreicherung des Eisendextrans

Während der Konzentrationsverlauf im Serum Hinweise auf die tatsächlich ins Gewebe gelangende Menge des Arzneimittels sowie dessen Resorptionsverhalten und die Metabolisierung geben, kann anhand des pathohistologischen Bildes eine

Aussage über die Anreicherung des Injektionspräparates im Bereich der Injektionsstelle getroffen werden. Sowohl bei der makroskopischen Betrachtung der Transversalschnitte an der Injektionsstelle als auch bei der histologischen Betrachtung tritt ein ähnliches Verteilungsmuster des Eisenpräparates bei beiden Injektionsarten auf. Das intramuskuläre Verteilungsmuster ist makroskopisch bei der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel nicht zu unterscheiden. Allerdings ist das subkutane Fettgewebe an der Injektionsstelle nach der nadellosen Injektion stärker durch das Eisendextran braun verfärbt, als nach der Injektion mit Nadel (Abbildungen 12, 13). Bei Injektion in subkutane Fettdepots oder in schlecht vaskularisierte Gebiete der Unterhaut kann die Wirkung des Arzneimittels verzögert oder unter Umständen gar nicht erfolgen (FREY, 2009). WILLIAMS et al. (2000) vermuten beim Einsatz des nadellosen Injektionsgerätes *Biojector*[®] beim Menschen einen Zusammenhang zwischen vermehrter Anreicherung des Injektionspräparates im subkutanen Fettgewebe und der Verwendung eines ungeeigneten Durchmessers der Injektionsdüse. Der Düsendurchmesser muss demnach an die Körpermasse und den individuellen Fettgehalt angepasst werden. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen INOUE et al. (2010) die aus ihrer Studie ableiten konnten, dass eine oberflächliche Verteilung des Injektionspräparates auf eine geringere Injektionsgeschwindigkeit zurückzuführen ist. Die Injektionsgeschwindigkeit wiederum hängt unter anderem vom Düsendurchmesser ab. Bei den Versuchstieren der durchgeführten Studie wurden die Herstellerangaben zur Wahl des geeigneten Düsendurchmessers befolgt, wobei nur zwei unterschiedliche Düsen zur Verfügung standen. Ein Versuch zur nadellosen Injektion unter Verwendung von unterschiedlichen Düsendurchmessern und damit Injektionsgeschwindigkeiten könnte Aufschluss darüber geben, in welchem Maße diese Faktoren die Bioverfügbarkeit des applizierten Arzneimittels verändern.

5.2.2.3 Verluste an Injektionsvolumen

Als weitere Ursache für die reduzierte Bioverfügbarkeit von nadellos applizierten Injektionspräparaten im Vergleich zur Injektion mit Nadel wird von mehreren Autoren ein Rückfluss des Injektionspräparates aus der Injektionsstelle beschrieben (SCHLOESSER et al., 2008; STACHOWIAK et al., 2009). Auch dieser Grund kann bei der durchgeführten Studie nicht ausgeschlossen werden. Bei Saugferkeln am

14. Lebenstag kann in der Tat ein Zurückfließen des Eisendextran-Präparates aus der Injektionsstelle, gehäuft nach der nadellosen Injektion, beobachtet werden. Dies führt dazu, dass bei der nadellosen Injektion eine geringere Dosis das intramuskuläre Gewebe erreicht. Auch JONES et al. (2005) beschreiben in ihrer Studie, dass bei der einmaligen Injektion von 0,08 mg einer Injektionslösung mit einem nadellosen Injektionsgerät effektiv nur 0,03 mg in das Hautgewebe eindringen. Der Rest prallt beim nadellosen Injektionsvorgang von der Haut zurück und gelangt nicht ins Gewebe. Dabei werden unterschiedliche potenzielle Unsicherheitsfaktoren der nadellosen Injektionstechnik in der Literatur erwähnt, die zu einer Verringerung der ins Gewebe injizierten Dosis führen können. JONES et al. (2005) vermuten als Hauptursache für die Verluste am Injektionsvolumen die Dicke der Haut und die Stärke der Behaarung. Weitere Autoren berichten von Unsicherheitsfaktoren bei der nadellosen Injektion durch Variationen der Hauteigenschaften (SCHRAMM und MITRAGOTRI, 2002; WAGNER et al., 2004; BAXTER und MITRAGOTRI, 2005) oder des Raumklimas (STACHOWIAK et al., 2009) oder der Empfindlichkeit des Wirkstoffes (THEINTZ und SIZONENKO, 1991). Mit nadellosen Injektionsgeräten wie dem *Pulse*® 250 ist es derzeit noch nicht möglich, sich an die wechselnden physikalischen Eigenschaften der Haut eines jeden Individuums anzupassen (THEINTZ und SIZONENKO, 1991; SCHRAMM und MITRAGOTRI, 2002). Diese Unsicherheitsfaktoren können bei der Injektion mit Nadel vernachlässigt werden.

Welche Rolle die physikalischen Eigenschaften des Injektionsstrahles, wie Düsendurchmesser und die Injektionsgeschwindigkeit spielen, die laut BAXTER und MITRAGOTRI (2005) als ausschlaggebend für die Effizienz einer nadellosen Injektion zu bewerten sind, wurde in dieser Studie nicht genauer untersucht.

Es muss berücksichtigt werden, dass bei der histologischen Untersuchung nur Ausschnitte der Injektionsstelle beurteilt werden, und die Auswertung weniger quantitativ sondern vielmehr deskriptiv erfolgt. Die Ermittlung des tatsächlich ins Gewebe gelangten Volumens ist damit nicht möglich, daher bleibt unklar, ob das verringerte Injektionsvolumen aufgrund eines zurückfließenden Anteiles oder die reduzierte Resorptionsrate aufgrund vermehrter Anreicherung im subkutanen Fettgewebe des nadellos injizierten Eisendextrans für die geringeren Wirkstoffkonzentrationen im Blut die Hauptursache darstellt.

6 Schlussfolgerung

Ziel des Versuchsvorhabens ist es, die nadellose Injektion unter Verwendung des *Pulse*[®] 250 Injektionsgerätes und die konventionelle Injektion mit Nadel vergleichend zu beurteilen. Hauptkriterien bei der Beurteilung sind die Verträglichkeit und Zuverlässigkeit der Injektionsverfahren.

Aufgrund von oft nicht nachweisbaren Unterschieden beschränken sich vorausgegangene Studien auf die Aussage, dass die nadellose Injektionsverfahren Sicherheit für die behandelten Tiere bieten und effektiv in der Anwendung seien (HOUSER et al., 2004). Dieser Aussage kann nach Durchführung dieser Studie nur mit Einschränkungen zugestimmt werden.

Der Einsatz der nadellosen Injektion zur intramuskulären Verabreichung eines Eisendextran-Präparates bei Saugferkeln am 3. Lebenstag kann, ebenso wie die Injektion mit Nadel, bis zum Absetzen der Entstehung einer Saugferkelanämie vorbeugen. In allen Versuchsgruppen liegt die Eisenkonzentration im Serum der Saugferkel unabhängig von der Injektionsmethode zu allen Messzeitpunkten nach der Injektion von Eisendextran über den minimalen Grenzwerten. Die pathoanatomische und histologische Auswertung zeigt, dass die vom Hersteller angegebenen Druckeinstellungen für intramuskuläre Injektionen geeignet sind, das Eisendextran-Präparat intramuskulär zu verteilen und die erwünschte Wirkstoffkonzentration im Blut zu erzielen.

Nach der Injektion mit Nadel ist die Arzneimittelkonzentration im Serum der Versuchsgruppen jedoch deutlich höher als nach der nadellosen Injektion. Das kann auf Verluste beim Abprallen der Injektionslösung von der Haut und durch reduzierte Resorptionsraten bei Anreicherung im subkutanen Fettgewebe zurückgeführt werden. Fehler bei der Applikation können durch die Wahl eines ungeeigneten Düsendurchmessers und Injektionsdruckes für das entsprechende Alter der Tiere und deren Hautbeschaffenheit verstärkt werden. Da nur zwischen zwei Düsendurchmessern gewählt werden kann und die Herstellerangaben zur Wahl des geeigneten Injektionsdruckes in Abhängigkeit von der Viskosität des Injektionspräparates zu treffen ist, die in der Regel unbekannt ist, können Fehler bei der Applikation von Arzneimitteln auftreten.

Ob die intramuskuläre Verteilung und Resorption von Arzneimitteln unterschiedlicher Viskosität ähnlich verläuft, wie bei Eisendextran, kann nicht abschließend geklärt werden, da nur das Eisendextran-Präparat im Gewebe nativ und durch Anfärbung nach Turnbull sichtbar ist. Es kann nur vermutet werden, dass die intramuskuläre Verteilung der isotonischen Kochsalzlösung und der Vitamin-E-Selen Lösung ähnlich verlaufen. Wie anhand der Turnbull-Färbung ersichtlich ist, scheint das Verteilungsmuster der Entzündungsreaktion im Gewebe dem Verteilungsmuster des Arzneimittels zu entsprechen. Die Betrachtung des Verteilungsmusters der Entzündung nach der Injektion von Vitamin-E-Selen und isotonischer Kochsalzlösung führt zu der Annahme, dass die Verteilung des Injektionspräparates der des Eisendextrans entspricht. Die Verteilung des Injektionspräparates bei der nadellosen Injektion erfolgt wie bei der Injektion mit Nadel entlang der Leitstrukturen im intermuskulären Gewebe.

Eine messbare Stressantwort in Form von Cortisol-Ausschüttung wird durch beide Injektionsmethoden hervorgerufen. Diese ist nach der nadellosen Injektion höher als nach der herkömmlichen Kanüleninjektion. Bei 14 Tage alten Ferkeln war der Unterschied jedoch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu ist der Anstieg der Cortisolkonzentration bei 3 Tage alten Saugferkeln nach der nadellosen Injektion signifikant höher als nach der Injektion mit Nadel. Da auch der maximale Anstieg des Serumcortisols im Vergleich zum Basalwert bei dieser Versuchsgruppe höher ist und die Werte nach dem Anstieg stark streuen, wird von einer allgemein erhöhten Sensitivität der Tiere dieser Gruppe ausgegangen, die auf die zufällige Verteilung der Versuchstiere auf die Versuchsgruppen zurückzuführen ist.

Bei der klinischen Untersuchung der Injektionsstelle ist die Lokalreaktion nach der nadellosen Injektion signifikant stärker ausgeprägt als nach der Injektion mit Nadel. Insbesondere für Arzneimittel hoher Viskosität (Vitamin-E-Selen, Eisendextran) kann diese Tendenz beobachtet werden. Bei Arzneimitteln mit geringer Viskosität, wie isotonische Kochsalzlösung, hat die Wahl der Injektionsmethode einen zu vernachlässigenden Einfluss auf die Entstehung von Lokalreaktionen. Unterschiede bei der Ausprägung der Lokalreaktion sind bei Arzneimitteln höherer Viskosität deutlicher zu erkennen.

Bei der histologischen Untersuchung der Lokalreaktion unterscheiden sich die Injektionsmethoden nicht hinsichtlich der Ausprägung der Entzündungsreaktion

zwischen der nadellosen Injektion und der Injektion mit Nadel. Auch treten bei beiden Injektionsverfahren gleichermaßen punktuelle Muskelläsionen an der Perforationsstelle auf, und die Verteilung des Injektionspräparates erfolgt auf dem Weg des geringsten Widerstandes entlang von Leitstrukturen. Das häufig geäußerte Vorurteil, dass die nadellose Injektion generell gewebeschonender sei und den Stress der Tiere reduziere, ist demnach nicht haltbar.

7 Zusammenfassung

In der durchgeführten Studie wurden die nadellose Injektion und die konventionelle Injektion mit Nadel für die intramuskuläre Applikation von Arzneimitteln miteinander verglichen. Für die nadellose Injektion wurde das druckluftgesteuerte Injektionsgerät *Pulse® 250* (*Pulse Needlefree Systems*, Kansas, USA, Vertrieb durch *Schippers*, Kerken) zur intramuskulären Injektion verwendet, das für den Einsatz an Schweinen vorgesehen ist.

Das Injektionsverfahren wurde im Vergleich zur konventionellen Injektion mit Nadel auf seine Verträglichkeit und Zuverlässigkeit untersucht. Dazu wurden 3 Injektionspräparate mit unterschiedlicher Viskosität verwendet.

183 Saugferkeln wurde am 14. Lebenstag zu gleichen Teilen eine Injektion von 2 ml isotonischer Kochsalzlösung, Eisendextran oder Vitamin-E-Selen intramuskulär verabreicht. Die Injektionspräparate, die sich in ihrer Viskosität voneinander unterschieden, wurden entweder mit einer herkömmlichen Injektionskanüle oder mit dem nadellosen Injektionsgerät appliziert. Zudem erhielten 62 weitere Saugferkel am 3. Lebenstag eine Eisendextran-Injektion mit denselben Injektionsmethoden. Die Injektionsstelle wurde visuell und palpatorisch beurteilt sowie vor und nach der Injektion die Cortisol-, CK- und AST-Konzentration im Serum bestimmt. Nach einer Injektion von Eisendextran wurde zusätzlich die Eisenkonzentration im Serum der entsprechenden Ferkel bestimmt. Bei Saugferkeln, die ihre Eisendextran-Injektion am 3. Lebenstag erhalten hatten, wurde die Blutabnahme zur Messung der Eisenkonzentration in wöchentlichen Abständen bis zum Absetzen fortgeführt. Anhand dieser Ergebnisse wurde die Zuverlässigkeit des Injektionsverfahrens beurteilt.

Zur pathoanatomischen und –histologischen Untersuchung der Injektionsstellen wurden insgesamt 36 Tiere nach der Injektion eines der drei Injektionspräparate euthanasiert.

Die klinische Untersuchung der Injektionsstellen ergab ein signifikant häufigeres Auftreten von makroskopisch sichtbaren Lokalreaktionen nach der nadellosen Injektion im Vergleich zur Injektion mit Nadel. Die mittlere Ausdehnung der Lokalreaktion und der mittlere Score der Merkmale Umfangsvermehrung, Verhärtung

und Verfärbung an der Injektionsstelle war nach der nadellosen Injektion signifikant höher als nach der Injektion mit Nadel.

In Bezug auf die injektionsbedingte Stressreaktion ergab die Auswertung der Laborparameter Cortisol, CK und die Berechnung des CK/AST-Quotienten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Injektionsverfahren bei Saugferkeln am 14. Lebenstag. Bei Saugferkeln am 3. Lebenstag war die mittlere Maximalkonzentration des Cortisols nach der nadellosen Injektion signifikant höher als nach der Injektion mit Nadel.

Hinsichtlich der Gewebeläsionen der Muskulatur konnten anhand der Messung der CK-Konzentration und der Berechnung des CK/AST-Quotienten bei keiner Versuchsgruppe signifikante Unterschiede festgestellt werden.

Die Eisenkonzentration im Serum war nach der nadellosen Injektion signifikant niedriger im Vergleich zur Injektion mit Nadel. Trotzdem war das nadellose Injektionsverfahren geeignet, um mittels einer Applikation von Eisendextran den Zustand des latenten Eisenmangels zu beheben und der Entstehung einer Anämie bei Saugferkeln vorzubeugen.

Bei der histologischen Auswertung der Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle wurden keine Unterschiede hinsichtlich des Entzündungstyps und -grades zwischen den Injektionsverfahren festgestellt. Sowohl bei der Injektion mit Nadel als auch bei der nadellosen Injektion wurde eine Zerstörung von Muskelfasern an der Perforationsstelle nachgewiesen. Durch geeignete Druckeinstellung konnte bei der nadellosen Injektion wie bei der Injektion mit Nadel eine zuverlässige intramuskuläre Verteilung des Injektionspräparates erreicht werden.

Eine Anwendung des nadellosen Injektionsgerätes bei neugeborenen Saugferkeln kann aufgrund des erheblichen injektionsbedingten Anstieges der Cortisolkonzentration sowie der reduzierten Bioverfügbarkeit nicht uneingeschränkt empfohlen werden.

8 Summary

The objective of this study was to compare the needle-free injection technique to traditional injection with needle and syringe for intramuscular drug delivery. For needle-free injection, the airpowered injection device *Pulse[®] 250* (*Pulse Needlefree Systems*, Kansas, USA, provided from *Schippers*, Kerken), that has been suggested for the use in swine industry, was used to achieve intramuscular drug delivery.

Both injection methods were evaluated for tolerability and effectiveness of drug delivery. Therefore 3 preparations of different viscosity were used.

183 piglets were selected at the age of 14 days and subjected to one of three intramuscular treatments with saline solution, iron dextrane or vitamin-E-selenium in an equal ratio. The drugs that differed from each other by their viscosity were injected either by needle-free device or conventional needle and syringe. Furthermore 62 piglets were selected at the age of 3 days and assigned to a treatment with iron dextrane by either injection method. Injection sites were visually inspected and palpated and blood samples were collected prior as well as after the injection and the serum was tested for cortisol, CK and AST levels. These parameters served to evaluate the tolerability of the injection. After injection of iron dextrane, the serum was tested for iron levels, respectively. Blood sampling and measurement of iron levels in the trial group supplemented with iron-dextrane on day 3 was pursued weekly until weaning. These measurements served to evaluate the effectiveness of drug delivery.

Additionally a total of 36 animals were sacrificed after injection of either drug for pathoanatomical and histological analysis of the injection site.

Clinical observation of the injection sites revealed that local reactions occurred significantly more frequent after needle-free injection when compared to injection with needle and syringe. The mean extent of local reaction and the mean score of symptoms such as swelling, induration and occurrence of erythema or other colorings was significantly higher after needle-free injection compared to injection with needle and syringe.

With reference to the stress response induced by either injection method the analysis of cortisol levels as well as CK levels and CK/AST ratio revealed no significant difference between the injection types within the trial groups at the age of 14 days.

Yet in the trial group at the age of 3 days the mean maximum of cortisol levels was significantly higher after needle-free injection compared to injection with needle and syringe.

In terms of muscular tissue damage the measurement of CK and the analysis of CK/AST ratio revealed no significant differences for all treatment groups.

Serum iron levels after administration of iron-dextrane by traditional needle and syringe was significantly higher as opposed to needle-free injection. Still iron supplementation by a needleless injector led to recovery from a pre-anemic state and efficiently prevented iron deficiency in piglets.

Histological studies of the injection site showed no difference regarding type and degree of injection site reactions induced by either injection method. Muscular tissue damage could be observed after the use of both injection types. Adjustment of the operating air pressure ensured appropriate intramuscular deposition of the injection fluid after needle-free injection as well as after injection with needle and syringe.

Due to the considerable rise of cortisol levels as well as the poor bioavailability the airpowered transdermal injection device is not considered as suitable injection method for drug delivery in newborn piglets.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 — <i>Pulse® 250</i> (<i>Pulse Needlefree Systems</i> , Kansas, USA): Dosier-einheit (2 ml) mit Überdruckventil und manueller Injektionsdruckregulierung verbunden mit Hochdruckleitung zum Handstück zur nadellosen Injektion	35
Abbildung 2 — Herstellung von 4-5 mm dünnen Scheiben aus dem Gewebe an der Injektionsstelle, beginnend von der Seite der Hautoberfläche	41
Abbildung 3 — Schematische Darstellung der Untersuchungsebenen 1 bis 5 an der Injektionsstelle für die Einbettung in Paraffin (P) und Kunststoff (K)	42
Abbildung 4 — Fließkurve der gemessenen Viskosität für die Arzneimittel NaCl 0,9%®, Myofer 200® und Vitamin-E-Selen® jeweils nach Dreifachmessung als Funktion der Schergeschwindigkeit, Zeit und Temperatur	46
Abbildung 5 — Mittlerer Score der Lokalreaktionen bei Saugferkeln am 14. Lebenstag als Summe der Scores 4 h und 24 h nach der Injektion, aufgeteilt nach Injektionspräparat und Injektionsmethode.....	54
Abbildung 6 — Verlauf der mittleren Cortisolkonzentration bei Saugferkeln am 3. Lebenstag nach der Injektion von Eisendextran durch Interpolation der mittleren Cortisolkonzentration vor der Injektion und 30 min, 4 h und 24 h nach der Injektion (* $p \leq 0,001$)	62
Abbildung 7 — Verlauf der mittleren Cortisolkonzentration bei Saugferkeln am 14. Lebenstag nach der Injektion von Eisendextran durch Interpolation der mittleren Cortisolkonzentration vor der Injektion und 30 min, 4 h und 24 h nach der Injektion.....	64
Abbildung 8 — Verlauf der mittleren CK-Konzentration im Serum von Saugferkeln nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, Vitamin-E-Selen und Eisendextran durch Interpolation der mittleren CK-Konzentration vor sowie 30 min, 4 h und 24 h nach der Injektion	66

Abbildung 9 — Verlauf der mittleren Eisenkonzentration im Serum von Saugferkeln nach der Injektion von Eisendextran am 3. Lebenstag, durch Interpolation der Messwerte	73
Abbildung 10 — Verlauf der mittleren Eisenkonzentration im Serum von Saugferkeln nach der Injektion von Eisendextran am 3. Lebenstag, durch Interpolation der Messwerte	75
Abbildung 11 — Verteilung von Eisendextran im Gewebe an der Injektionsstelle, betrachtet am Transversalschnitt aus der Halsmuskulatur, links: 24 Stunden nach nadelloser Injektion und rechts: 24 Stunden nach Injektion mit Nadel	78
Abbildung 12 — Injektionsstelle in der ersten Untersuchungsebene (1P), 24 Stunden nach der Injektion von Eisendextran. Links nach Injektion per Nadel, rechts nach der nadellosen Injektion.	80
Abbildung 13 — Injektionsstelle in der ersten Untersuchungsebene (1P), 7 d nach der Injektion von Eisendextran. Links nach Injektion per Nadel, rechts nach der nadellosen Injektion.....	80
Abbildung 14 — NaCl Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion: Ggr. sternförmige endomysiale entzündliche Infiltration mit überwiegend neutro-philten Granulozyten sowie wenigen Makrophagen, zusätzlich ggr. Einblutung. Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel: Ggr. betont perivaskuläre entzündliche Infiltration mit einzelnen neutrophilen Granulozyten und Makro-phagen.	85
Abbildung 15 — NaCl Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion: Fokal sternförmig ausgedehnte Fibrose des Endomysiums mit zentraler Muskelfaseratrophie und Muskelfaseruntergang sowie peripheren Muskelknospen; resorptive Entzündung durch Makrophagen und einzelnen neutrophilen Granu-lozyten. Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: Kleinherdige Muskelnekrose und Fibrose mit kollagenen Fasern; endomysiale Fibrose der umgebenden Skelettmuskulatur; keine Entzündungszellinfiltrate in diesem Ausschnitt erkennbar.	87

-
- Abbildung 16 — Vit-E-Se Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion: Rund umschriebene hgr. ausgedehnte Fibrininsudation im Bereich des perimysialen Fettgewebes mit Fettgewebstnekrosen und multifokal ggr. Einblutung sowie ggr. Entzündungszellinfiltration unter Beteiligung von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel: Bandartig umschriebene hgr. ausgedehnte Fibrininsudation mit gleichförmigem Muskelfaseruntergang und entzündlicher Infiltration durch neutrophile Granulozyten und einzelne Makrophagen. 90
- Abbildung 17 — Vit-E-Se Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion: Hochgradig ausgedehnte Fibrose innerhalb der Muskulatur; Muskelfaseruntergang und -atrophie, Nachweis einzelner mineralisierter Muskelfasern; daneben multiple Muskelknospen. Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: Sternförmig ausgedehnte Fibrose mit ggr. entzündlicher Infiltration durch Lymphozyten; hgr. periphere Muskelfaseratrophie sowie einzelne Muskelfaserknospen. 92
- Abbildung 18 — Eisendextran Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion: Hgr. ausgedehnte Fibrininsudation und multiple Hohlräume innerhalb des perimysialen Fettgewebes mit mgr. Ansammlung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten; ggr. multifokale Einblutung; Muskelfasernekrosen in der angrenzenden Skelettmuskulatur mit begleitender resorptiver Entzündung unter Beteiligung von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel: Mgr. herdförmige Fibrininsudation innerhalb des Endomysiums mit zentraler Hohlraumbildung und entzündlicher Infiltration durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen; Muskelfaseruntergang innerhalb der angrenzenden Muskulatur mit begleitender resorptiver Entzündung. 95
- Abbildung 19 — Eisendextran Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion: Bandartige Fibrosierung, sich über das perimysiale Bindegewebe erstreckend, mit ggr. entzündlicher Infiltration unter Beteiligung von überwiegend Makrophagen mit braun pigmentierten Strukturen im Zellinneren, sowie

einzelnen Lymphozyten; ggr. Muskelzelluntergang im Bereich der Fibrinexsudate und einzelne atrophische Fasern. Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: Groß-flächige, bandartig ausgedehnte perimysiale Fibrosierung mit mgr. Zellinfil-tration unter Beteiligung von Lymphozyten und braunes Pigment enthaltenden Makrophagen.	97
Abbildung 20 — Eisendextran Oben: 24 Stunden nach der nadellosen Injektion, Unten: 24 Stunden nach der Injektion mit Nadel: In Spezialfärbung (Turnbull) Nachweis von Eisen innerhalb von Makrophagen.....	98
Abbildung 21 — Eisendextran Oben: 7 d nach der nadellosen Injektion, Unten: 7 d nach der Injektion mit Nadel: In Spezialfärbung (Turnbull) diffuser Eisennachweis im perimysialen Binde- und Fettgewebe, nur vereinzelt Makro-phagen mit Eisen im Zellinneren.	99

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Druckeinstellung <i>Pulse</i> [®] 250 für Saugferkel verschiedener Altersgruppen und unterschiedlicher Viskosität der Injektionspräparate	34
Tabelle 2 – Gruppeneinteilung für die klinischen Untersuchungen	36
Tabelle 3 – Bewertung der Lokalreaktion anhand eines klinischen Scores	38
Tabelle 4 – Gruppeneinteilung für die pathohistologische Untersuchung	39
Tabelle 5 – Viskosität der Injektionspräparate mit Standardabweichung der Werte aller 3 Messvorgänge im Messintervall von 30/s bis 100/s	47
Tabelle 6 – Anzahl der Tiere bei denen die Lokalreaktion Umfangsvermehrung, Verfärbung, Verhärtung und Blutung an der Injektionsstelle auftrat, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden.....	48
Tabelle 7 – Mittlerer Score der Lokalreaktionen bei Saugferkeln am 3. Lebens-tag als Summe der Scores 4 h, 24 h und 7 d nach der Injektion von Eisen-dextran, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden.....	50
Tabelle 8 – Maximale Ausdehnung der Lokalreaktion an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanz des Unterschiedes zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode.....	50
Tabelle 9 – Maximale Ausprägung der Merkmale Umfangsvermehrung, Verfärbung und Verhärtung der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode	51
Tabelle 10 – Mittlerer Score der Lokalreaktionen bei Saugferkeln am 14. Lebenstag als Summe der Scores 4 h und 24 h nach der Injektion, mit Signifikanz der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden	53
Tabelle 11 – Maximale Ausdehnung der Lokalreaktion an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode.....	55

Tabelle 12 — Maximale Ausprägung von Schwellungen an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode	56
Tabelle 13 — Maximale Ausprägung von Verfärbungen der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode	57
Tabelle 14 — Maximale Ausprägung von Verhärtungen an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode	58
Tabelle 15 — Auftreten von Blutungen an der Injektionsstelle bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Häufigkeitsverteilungen je nach Injektionsmethode	59
Tabelle 16 — Mittlere Cortisolkonzentrationen in nmol/l vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden.....	60
Tabelle 17 — Mittlere Cortisolkonzentrationen in nmol/l vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion bei Saugferkeln am 14. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden	63
Tabelle 18 — Asymptotische Signifikanz (p-Werte) der Unterschiede der mittleren Cortisolkonzentrationen 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion im Vergleich zum Basalwert innerhalb der Versuchsgruppen	65
Tabelle 19 — Mittlere CK-Konzentrationen in U/l vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden.	67
Tabelle 20 — Mittlere CK-Konzentrationen in U/l im Serum von Saugferkeln am 14. Lebenstag vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden	68
Tabelle 21 — Mittleres Verhältnis zwischen CK und AST im Serum von Saugferkeln am vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden	70

Tabelle 22 — Mittlere Eisenkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ vor sowie 30 min, 1 h, 4 h, 24 h, 7 d, 14 d, 21 d und 28 d nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 3. Lebenstag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden	72
Tabelle 23 — Mittlere Eisenkonzentration in $\mu\text{mol/l}$ vor sowie 30 min, 1 h, 4 h und 24 h nach der Injektion von Eisendextran bei Saugferkeln am 14. Lebens-tag, mit Signifikanzen der Unterschiede zwischen den Injektionsmethoden.....	74
Tabelle 24 — Bewertung der Merkmale Umfangsvermehrung, Verfärbung, Verhärtung und deren Ausdehnung in cm sowie die Blutung an der Injektionsstelle	76
Tabelle 25 — Ausprägung der Entzündung bei jedem Tier in den Untersuchungsebenen 1P bis 5P.....	81
Tabelle 26 — Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle nach der Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, aufgeteilt nach Entzündungszellen und sonstigen Merkmalen.....	83
Tabelle 27 — Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle nach der Injektion von Vitamin-E-Selen, aufgeteilt nach Entzündungszellen und sonstigen Merkmalen	88
Tabelle 28 — Entzündungsmerkmale an der Injektionsstelle nach der Injektion von Eisendextran, aufgeteilt nach Entzündungszellen und sonstigen Merkmalen	93

11 Literaturverzeichnis

ACKERMANN M.R. (2009a)

Akute Entzündung, In McGavin, M.D., Zachary, J.F.: Pathologie der Haustiere, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, S. 95-99.

ACKERMANN M.R. (2009b)

Chronische Entzündung und Wundheilung, In McGavin, M.D., Zachary, J.F.: Pathologie der Haustiere, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, Kap. 4, S. 143-146.

APLEY M.D., COETZEE J.F., IMERMAN P.M., KARRIKER L.A., GEHRING R. (2007)

Ampicillin pharmacokinetics in swine following needle-free, intramuscular, and intravenous administration, J Vet Pharmacol Ther, 30 (5), 417-421.

ARAPOSTATHIS K.N., DABARAKIS N.N., COOLIDGE T., TSIRLIS A., KOTSANOS N. (2010)

Comparison of acceptance, preference, and efficacy between jet injection INJEX and local infiltration anesthesia in 6 to 11 year old dental patients, Anesth Prog, 57 (1), 3-12.

ARENDT-NIELSEN L., EGEKVIST H., BJERRING P. (2006)

Pain following controlled cutaneous insertion of needles with different diameters, Somatosens Mot Res, 23 (1-2), 37-43.

ARORA A., HAKIM I., BAXTER J., RATHNASINGHAM R., SRINIVASAN R., FLETCHER D.A., MITRAGOTRI S. (2007)

Needle-free delivery of macromolecules across the skin by nanoliter-volume pulsed microjets, Proc Natl Acad Sci U S A, 104 (11), 4255-4260.

BAUMGÄRTNER W. (2007)

Entzündung, In Baumgärtner, W.: Pathohistologie für die Tiermedizin, Enke, Stuttgart, Kap. 3, S. 13-23.

BAXTER J., MITRAGOTRI S. (2005)

Jet-induced skin puncture and its impact on needle-free jet injections: experimental studies and a predictive model, J Control Release, 106 (3), 361-373.

BAXTER J., MITRAGOTRI S. (2006)

Needle-free liquid jet injections: mechanisms and applications, Expert Rev Med Devices, 3 (5), 565-574.

BENNETT C.R., MUNDELL R.D., MONHEIM L.M. (1971)

Studies on tissue penetration characteristics produced by jet injection, J Am Dent Assoc, 83 (3), 625-629.

BENNETT J., NICHOLS F., ROSENBLUM M., CONDRY J. (1998)

Subcutaneous administration of midazolam: a comparison of the Bioject jet injector with the conventional syringe and needle, J Oral Maxillofac Surg, 56 (11), 1249-1254.

BICKHARDT K. (2004)

Muskelerkrankungen, In Waldmann, K.-H., Wendt, M.: Lehrbuch der Schweinekrankheiten, Parey, Stuttgart, Kap. 11, S. 239-241.

BICKHARDT K., SCHWABENBAUER C. (1981)

Zur diagnostischen Bedeutung der Isoenzyme der Creatin-Kinase (CK), Dtsch Tierarztl Wochenschr, 88 (9), 368-371.

BOLLWAHN W., KNÖRL H., HEINRITZI K. (1983)

Klinik und Diagnose des latenten Eisenmangels beim Ferkel, Der Praktische Tierarzt, 64 (4), 294 - 297.

BOSTEDT H., REINHARDT H.J. (1980)

Zur Entwicklung des Serumprofiles bei Ferkeln in den ersten Lebensstunden und -tagen, Zentralbl Veterinarmed A, 27 (2), 85-95.

CANNON J.E., MORGAN J.B., MCKEITH F.K., SMITH G.C., SONKA S., HEAVNER J., MEEKER D.L. (1996)

Pork Chain Quality Audit Survey: Quantification Of Pork Quality Characteristics, Journal of Muscle Foods, 7 (1), 29-44.

CANTER J., MACKEY K., GOOD L.S., ROBERTO R.R., CHIN J., BOND W.W., ALTER M.J., HORAN J.M. (1990)

An outbreak of hepatitis B associated with jet injections in a weight reduction clinic, Arch Intern Med, 150 (9), 1923-1927.

CHASE C.C.L., DANIELS C.S., GARCIA R. (2008)

Needle-free injection technology in swine: Progress toward vaccine efficacy and pork quality, Journal of Swine Health and Production, 16 (5), 254-261.

CHAVEZ MORENO J., BICKHARDT K. (1997)

Zum Nachweis von Gewebeläsionen nach intramuskulärer Injektion durch Bestimmung der Creatin-Kinase-Aktivität im Blutplasma, Dtsch Tierarztl Wochenschr, 104 (12), 512-515.

CHROUSOS G.P. (2009)

Stress and disorders of the stress system, Nat Rev Endocrinol, 5 (7), 374-381.

COOK D.L., KRUSE F., PHILLIPS R., SICK F., OKKINGA K., POLSON D., DEMONTIS G. (2003)

Pulse 200 Effective Application Method for PRRS Vaccine in Gilts. In: 4th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases, Rome.

-
- COOPER J.A., BROMLEY L.M., BARANOWSKI A.P., BARKER S.G.** (2000)
Evaluation of a needle-free injection system for local anaesthesia prior to venous cannulation, *Anaesthesia*, 55 (3), 247-250.
- DANIELS C.S.** (2008)
Survey of Injection Methodologies and Carcass Defects in Pork Production. In *Pork Checkoff* (Texas, Circle H Animal Health Headquarters).
- DE JONG I.C., PRELLE I.T., VAN DE BURG WAL J.A., LAMBOOIJ E., KORTE S.M., BLOKHUIS H.J., KOOLHAAS J.M.** (2000)
Effects of environmental enrichment on behavioral responses to novelty, learning, and memory, and the circadian rhythm in cortisol in growing pigs, *Physiol Behav*, 68 (4), 571-578.
- DINNISS A.S., MELLOR D.J., STAFFORD K.J., BRUCE R.A., WARD R.N.** (1997)
Acute cortisol responses of lambs to castration using a rubber ring and/or a castration clamp with or without local anaesthetic, *N Z Vet J*, 45 (3), 114-121.
- EARLEY B., CROWE M.A.** (2002)
Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory responses, *J Anim Sci*, 80 (4), 1044-1052.
- ELGENEIDY A.K., BLOOM A.A., SKERMAN J.H., STALLARD R.E.** (1974)
Tissue reaction to jet injection, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 38 (4), 501-511.
- ELICKER S.** (2006)
Untersuchungen zur Festlegung tierschutzkonformer Injektionsvolumina bei Schweinen. Diss. Med. Vet. Ludwig-Maximilians Universität, München.
- EPSTEIN J.E., GORAK E.J., CHAROENVIT Y., WANG R., FREYDBERG N., OSINOWO O., RICHIE T.L., STOLTZ E.L., TRESPALACIOS F., NERGES J., NG J., FALLARME-MAJAM V., ABOT E., GOH L., PARKER S., KUMAR S., HEDSTROM R.C., NORMAN J., STOUT R., HOFFMAN S.L.** (2002)
Safety, tolerability, and lack of antibody responses after administration of a PfCSP DNA malaria vaccine via needle or needle-free jet injection, and comparison of intramuscular and combination intramuscular/intradermal routes, *Hum Gene Ther*, 13 (13), 1551-1560.
- ERHARDT W., HENKE J.** (2011)
Analgesie, In Erhardt, W., Henke, J., Haberstroh, J.: *Anästhesie & Analgesie beim Klein- und Heimtier*, Schattauer, Stuttgart, Kap. 11, S. 369 - 407.
- FIEBIG K.** (2009)
Die intradermale Impfung von Schweinen, *Schweinezucht und Schweinemast*, 35, 51-52.

FIGGE F.H., BARNETT D.J. (1948)

Anatomic evaluation of a jet injection instrument designed to minimize pain and inconvenience of parenteral therapy, *Am Pract Dig Treat*, 3 (4), 197-206.

FIGGE F.H., GELHAUS V.M. (1956)

A new injector designed to minimize pain and apprehension of parenteral therapy, *J Am Med Assoc*, 160 (15), 1308-1310.

FLÜCKIGER M. (1977)

Enzymaktivitäten in Serum und Organen des jungen Schweines. Bestimmung der Normwerte, Beurteilung der klinischen Verwendbarkeit und Vergleich mit Angaben für den Menschen, *Zentralbl Veterinarmed A*, 24 (3), 195-204.

FREY H.-H. (2009)

Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie, In Frey, H.-H., Löscher, W.: *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*, Enke, Stuttgart, Kap. 2.

GALLAGHER N.L., GILES L.R., WYNN P.C. (2002)

The development of a circadian pattern of salivary cortisol secretion in the neonatal piglet, *Biol Neonate*, 81 (2), 113-118.

GIUDICE E.L., CAMPBELL J.D. (2006)

Needle-free vaccine delivery, *Adv Drug Deliv Rev*, 58 (1), 68-89.

GREENBERG R.S., MAXWELL L.G., ZAHURAK M., YASTER M. (1995)

Preanesthetic medication of children with midazolam using the Biojector jet injector, *Anesthesiology*, 83 (2), 264-269.

GROCHOLL G., BICKHARDT K. (1988)

Zur Kinetik der Creatin-Kinase (CK) und Aspartat-Amino-Transferase (ASAT) im Blutplasma von Schweinen unterschiedlichen Alters, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 101 (10), 347-352.

GÜRTLER H. (1987)

Mittelwerte und Streuungsbereiche diagnostisch nutzbarer Parameter, In Kielstein, P., Wohlfarth, E.: *Schweinekrankheiten*, Enke, Stuttgart, Kap. 1, S. 1-19.

GUYTON A.C., HALL J.E. (2006)

Medical Physiology. Elsevier Saunders, Pennsylvania, Kap. 75.

HAY M., VULIN A., GÉNIN S., SALES P., PRUNIER A. (2003)

Assessment of pain induced by castration in piglets: behavioral and physiological responses over the subsequent 5 days, *Applied Animal Behaviour Science*, 82 (3), 201-218.

HEINRITZI K. (2006a)

Blutkrankheiten, In Heinritzi, K., Gindele, H.R., Reiner, G., Schnurrbusch, U.: *Schweinekrankheiten*, Ulmer, Stuttgart, Kap. 11, S. 51-61.

HEINRITZI K. (2006b)

Laboruntersuchung, In Heinritzi, K., Gindele, H.R., Reiner, G., Schnurrbusch, U.: Schweinekrankheiten, Ulmer, Stuttgart, Kap. 9, S. 35-40.

HEINRITZI K., PLONAIT H. (2004)

Blutkrankheiten, In Waldmann, K.-H., Wendt, M.: Lehrbuch der Schweinekrankheiten, Parey, Stuttgart, Kap. 9, S. 169-176.

HINGSON R.A., HUGHES J.G. (1947)

Clinical studies with jet injection; a new method of drug administration, Curr Res Anesth Analg, 26 (6), 221-230.

HOFFMAN P.N., ABUKNESHA R.A., ANDREWS N.J., SAMUEL D., LLOYD J.S. (2001)

A model to assess the infection potential of jet injectors used in mass immunisation, Vaccine, 19 (28-29), 4020-4027.

HOUSER T.A., SEBRANEK J.G., THACKER B.J., BAAS T.J., NILUBOL D., THACKER E.L., KRUSE F. (2004)

Effectiveness of transdermal, needle-free injections for reducing pork carcass defects, Meat Science, 68 (2), 329-332.

HOUTZAGERS C.M., BERNTZEN P.A., VAN DER STAP H., HEINE R.J., VAN DER VEEN E.A. (1988)

Absorption kinetics of short- and intermediate-acting insulins after jet injection with Medi-Jector II, Diabetes Care, 11 (9), 739-742.

IMSILP K., POAPOLATHEP A., S. P., PATTANATANANG K., NOONPUGDEE C., MOUNGTHAI K., ATTHI R., RUGSRI N., TOHNITI K., KASORNDORKBUA C. (2005)

Effectiveness of a needle-free injection system (Pulse250®) comparing to a conventional method on haemorrhagic septicaemia vaccination. In: Veterinary Medicine and Livestock Development Annual Conference, Bangkok.

INOUE N., TODO H., IIDAKA D., TOKUDOME Y., HASHIMOTO F., KISHINO T., SUGIBAYASHI K. (2010)

Possibility and effectiveness of drug delivery to skin by needle-free injector, Int J Pharm, 391 (1-2), 65-72.

JACKSON L.A., AUSTIN G., CHEN R.T., STOUT R., DESTEFANO F., GORSE G.J., NEWMAN F.K., YU O., WENIGER B.G. (2001)

Safety and immunogenicity of varying dosages of trivalent inactivated influenza vaccine administered by needle-free jet injectors, Vaccine, 19 (32), 4703-4709.

JENSEN K.H., PEDERSEN L.J., NIELSEN E.K., HELLER K.E., LADEWIG J., JORGENSEN E. (1996)

Intermittent stress in pigs: effects on behavior, pituitary-adrenocortical axis, growth, and gastric ulceration, Physiol Behav, 59 (4-5), 741-748.

JIMENEZ N., BRADFORD H., SEIDEL K.D., SOUSA M., LYNN A.M. (2006)

A comparison of a needle-free injection system for local anesthesia versus EMLA for intravenous catheter insertion in the pediatric patient, *Anesth Analg*, 102 (2), 411-414.

JONES G.F., RAPP-GABRIELSON V., WILKE R. (2005)

Intradermal vaccination for *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Journal of Swine Health and Production*, 13 (1), 19-27.

KANITZ E., OTTEN W., HAMEISTER T., TUCHSCHERER M., PUPPE B., TUCHSCHERER A. (2011)

Age-related changes in corticosteroid receptor expression and monoamine neurotransmitter concentrations in various brain regions of postnatal pigs, *J Neurosci Res*, 89 (7), 1134-1141.

KANITZ E., OTTEN W., TUCHSCHERER M., MANTEUFFEL G. (2003)

Effects of prenatal stress on corticosteroid receptors and monoamine concentrations in limbic areas of suckling piglets (*Sus scrofa*) at different ages, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 50 (3), 132-139.

KERN O. (1987)

Lokalverträglichkeit von Arznei- und Arzneihilfsstoffen bei intramuskulärer Injektion, *Tierärztliche Umschau*, 42, 768-775.

KOOLHAAS J.M., BARTOLOMUCCI A., BUWALDA B., DE BOER S.F., FLUGGE G., KORTE S.M., MEERLO P., MURISON R., OLIVIER B., PALANZA P., RICHTER-LEVIN G., SGOIFO A., STEIMER T., STIEDL O., VAN DIJK G., WOHR M., FUCHS E. (2011)

Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept, *Neurosci Biobehav Rev*, 35 (5), 1291-1301.

KRAFT W. (2006a)

Hämatologie, In Kraft, W.: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Schattauer, Stuttgart, Kap. 10, S. 43-77.

KRAFT W. (2006b)

Skelettmuskulatur, Knochen, Kalzium-, Phosphor-, Magnesiumstoffwechsel, In Kraft, W., Dürr, U.: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Schattauer, Stuttgart, Kap. 25, S. 251-253.

KRAFT W., DÜRR U.M. (2006)

Leber, In Kraft, W., Dürr, U.M.: *Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin*, Schattauer, Stuttgart, Kap. 13, S. 112-116.

KRUFF B., FRAHM K. (1984)

Zur Anwendung des Creatin-Kinase-Tests beim Ferkel, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 97 (9), 314-316.

LADEWIG J. (1994)

Stress, In Döcke, F.: Veterinärmedizinische Endokrinologie, Gustav Fischer Verlag, Jena, Kap. 15, S. 379-399.

LEFEBVRE H.P., LAROUTE V., BRAUN J.P., LASSOURD V., TOUTAIN P.L. (1996)

Non-invasive and quantitative evaluation of post-injection muscle damage by pharmacokinetic analysis of creatine kinase release, Vet Res, 27 (4-5), 343-361.

LEHNERT H. (2011)

Impfen mit 400 km/h. Top Agrar 1/2011, 34-36.

MCGAVIN D.M., MCGAVIN B.A.V. (2009)

Skelettmuskulatur - Diagnose von Muskelerkrankungen, In McGavin, M.D., Zachary, J.F.: Pathologie der Haustiere, Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München, Kap. 15, S. 880-885.

MCMEKAN C.M., MELLOR D.J., STAFFORD K.J., BRUCE R.A., WARD R.N., GREGORY N.G. (1997)

Effects of shallow scoop and deep scoop dehorning on plasma cortisol concentrations in calves, N Z Vet J, 45 (2), 72-74.

MEANEY M.J., AITKEN D.H., VIAU V., SHARMA S., SARRIEAU A. (1989)

Neonatal handling alters adrenocortical negative feedback sensitivity and hippocampal type II glucocorticoid receptor binding in the rat, Neuroendocrinology, 50 (5), 597-604.

MELLOR D.J., COOK C.J., STAFFORD K.J. (2000)

Quantifying Some Responses to Pain as a Stressor, In Moberg, G.P., Mench, J.A.: The Biology of Animal Stress, CABI Publishing, Cambridge, S. 171-198.

MERLOT E., MOUNIER A.M., PRUNIER A. (2011)

Endocrine response of gilts to various common stressors: a comparison of indicators and methods of analysis, Physiol Behav, 102 (3-4), 259-265.

MEURER D.G. (2007)

Entzündung, In: Allgemeine Pathologie
Schattauer, Stuttgart, Kap. 7, S. 117-143.

MITRAGOTRI S. (2005)

Immunization without needles, Nat Rev Immunol, 5 (12), 905-916.

MITRAGOTRI S. (2006)

Current status and future prospects of needle-free liquid jet injectors, Nat Rev Drug Discov, 5 (7), 543-548.

MOBERG G.P. (2000)

Biological Response to Stress: Implications for Animal Welfare, In Moberg, G.P., Mench, J.A.: The Biology of Animal Stress, CABI Publishing, Davis, California, USA, Kap. 1, S. 7 - 18.

MOLONY V., KENT J.E. (1997)

Assessment of acute pain in farm animals using behavioral and physiological measurements, J Anim Sci, 75 (1), 266-272.

MORMEDE P., ANDANSON S., AUPERIN B., BEERDA B., GUEMENE D., MALMKVIST J., MANTECA X., MANTEUFFEL G., PRUNET P., VAN REENEN C.G., RICHARD S., VEISSIER I. (2007)

Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare, Physiol Behav, 92 (3), 317-339.

MÖSTL E. (2009)

Spezielle Endokrinologie, In Engelhardt, W.: Physiologie der Haustiere, Enke, Stuttgart, Kap. 23.2, S. 477-494.

MOUSEL M.R., LEEDS T.D., WHITE S.N., HERRMANN-HOESING L.M. (2008)

Technical Note: Comparison of traditional needle vaccination with pneumatic, needle-free vaccination for sheep, J Anim Sci, 86 (6), 1468-1471.

OTAKE S., DEE S.A., ROSSOW K.D., JOO H.S., DEEN J., MOLITOR T.W., PIJOAN C. (2002)

Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by needles, Vet Rec, 150 (4), 114-115.

OTTEN W., KANITZ E., TUCHSCHERER A., NÜRNBERG G. (2001)

Effects of prenatal restraint stress on hypothalamic-pituitary-adrenocortical and sympatho-adrenomedullary axis in neonatal pigs, Animal Science, 73, 279-287.

PRAESTMARK JUUL K.A., BENGTSSON H., EYVING B., KILDEGAARD J., LAV S., POULSEN M., SERUP J., STALLKNECHT B. (2012)

Influence of hypodermic needle dimensions on subcutaneous injection delivery - a pig study of injection deposition evaluated by CT scanning, histology, and backflow, Skin Res Technol,

PREUSS H. (2012)

Regierung von Oberbayern ZAB - Zentrale Arzneimittelüberwachung Bayern, Persönliche Mitteilung, 17.02.2012

PRUNIER A., MOUNIER A.M., HAY M. (2005)

Effects of castration, tooth resection, or tail docking on plasma metabolites and stress hormones in young pigs, J Anim Sci, 83 (1), 216-222.

PSCHYREMBEL W. (2002)

Klinisches Wörterbuch, 259. Ausgabe. Walter de Gruyter, Berlin.

PULSE NEEDLEFREE SYSTEMS (2012)

Technology. <http://www.pulse-nfs.com/technology/#difference>, <http://www.pulse-nfs.com/technology/#difference> abgerufen am 09.03.2012

RAULT J.-L., LAY JR D.C., MARCHANT-FORDE J.N. (2011)

Castration induced pain in pigs and other livestock, *Applied Animal Behaviour Science*, 135 (3), 214-225.

RAY A.N., DIKEMAN M.E., CROW B.A., PHEBUS R.K., GROBBEL J.P., HOLLIS L.C. (2010)

Microbial translocation of needle-free versus traditional needle injection-enhanced beef strip loins, *Meat Sci*, 84 (1), 208-211.

REID U.V. (2010)

WHO best practices for injections and related procedures toolkit, World Health Organization, WHO Press, WHO/EHT/10.02

REINBOLD J.B., COETZEE J.F., HOLLIS L.C., NICKELL J.S., RIEGEL C.M., CHRISTOPHER J.A., GANTA R.R. (2010)

Comparison of iatrogenic transmission of *Anaplasma marginale* in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques, *Am J Vet Res*, 71 (10), 1178-1188.

RUIS M.A., TE BRAKE J.H., ENGEL B., EKKEL E.D., BUIST W.G., BLOKHUIS H.J., KOOLHAAS J.M. (1997)

The circadian rhythm of salivary cortisol in growing pigs: effects of age, gender, and stress, *Physiol Behav*, 62 (3), 623-630.

RUSHEN J. (2000)

Some Issues in the Interpretation of Behavioural Responses to Stress, In Moberg, G.P., Mench, J.A.: *The Biology of Animal Stress*, CABI Publishing, Cambridge, Kap. 2, S. 24-34.

SANN H. (2009)

Nozizeption und Schmerz, In Engelhardt, W.: *Physiologie der Haustiere*, Enke, Stuttgart, Kap. 5.2, S. 74-79.

SARNO M.J., BLASE E., GALINDO N., RAMIREZ R., SCHIRMER C.L., TRUJILLO-JUAREZ D.F. (2000)

Clinical immunogenicity of measles, mumps and rubella vaccine delivered by the Injex jet injector: comparison with standard syringe injection, *Pediatr Infect Dis J*, 19 (9), 839-842.

SCHLOESSER C.A., DANIELS C.S., COOK C.J., CIVIS C., LOSKUTOV A., KUHN M., SENN M., WAYNE S. (2008)

Accuracy and precision of Pulse Micro-dose Injection Device using DraxxinTM, Excede[®], Excenel[®] and sterile water, *American Association Of Swine Veterinarians*, 79-82.

SCHNEIDER U., BIRNBACHER R., SCHOBER E. (1994)

Painfulness of needle and jet injection in children with diabetes mellitus, *Eur J Pediatr*, 153 (6), 409-410.

SCHÖNREITER S., HUBER H., LOHMÜLLER V., ZANELLA A.J., UNSHELM J., HENKE J., ERHARDT W. (1999)

Speichelkortisol als Stressparameter bei Saugferkeln, *Tierärztl Prax Ausg G*, 27 (3), 175-179.

SCHRAMM J., MITRAGOTRI S. (2002)

Transdermal drug delivery by jet injectors: energetics of jet formation and penetration, *Pharm Res*, 19 (11), 1673-1679.

SHERGOLD O.A., FLECK N.A., KING T.S. (2006)

The penetration of a soft solid by a liquid jet, with application to the administration of a needle-free injection, *J Biomech*, 39 (14), 2593-2602.

SIMON J.K., CARTER M., PASETTI M.F., SZTEIN M.B., KOTLOFF K.L., WENIGER B.G., CAMPBELL J.D., LEVINE M.M. (2011)

Safety, tolerability, and immunogenicity of inactivated trivalent seasonal influenza vaccine administered with a needle-free disposable-syringe jet injector, *Vaccine*, 29 (51), 9544-9550.

SKARLANDTOVA H., BICKOVA M., NEUZIL P., MLCEK M., HRACHOVINA V., SVOBODA T., MEDOVA E., KUDLICKA J., DOHNALOVA A., HAVRANEK S., KAZIHNITKOVA H., MACOVA L., KITTNAR O. (2011)

Is there circadian variation in cortisol levels in young sows in heart catheterization?, *Prague Med Rep*, 112 (3), 184-192.

STACHOWIAK J.C., LI T.H., ARORA A., MITRAGOTRI S., FLETCHER D.A. (2009)

Dynamic control of needle-free jet injection, *J Control Release*, 135 (2), 104-112.

STALLJOHANN G. (2010)

Tiergesundheitsmanagement auf betrieblicher Ebene: Professionelle Schweinefütterung zur Unterstützung von Vitalität und Gesundheit, In Brede, W., Blaha, T., Brandt, H.R.: *Tiergesundheit Schwein*, DLG Verlag, Frankfurt am Main, Kap. 7, S. 200-233.

STATISTISCHES BUNDESAMT (2011)

Schlacht tier- und Fleischuntersuchung. In Land und Forstwirtschaft, Fischerei, Bundesamt, S., ed. (Wiesbaden, DeStatis).

SUS ONLINE (2010)

Video zur nadellosen Injektion. Magazin für Schweinezucht und Schweinemast, <http://www.susonline.de/videos/Video-zur-nadellosen-Injektion-640019.html>, am 12.03.2012

SZENTKUTI L. (2009)

Skelettmuskulatur, In Engelhardt, W.: Physiologie der Haustiere, Enke, Stuttgart, Kap. 7.1, S. 110-126.

TASSIS P.D., PAPATSIROS V.G., NELL T., MAES D., ALEXOPOULOS C., KYRIAKIS S.C., TZIKA E.D. (2012)

Clinical evaluation of intradermal vaccination against porcine enzootic pneumonia (*Mycoplasma hyopneumoniae*), Vet Rec, 170 (10), 261-265.

THEINTZ G.E., SIZONENKO P.C. (1991)

Risks of jet injection of insulin in children, Eur J Pediatr, 150 (8), 554-556.

THOMAS L. (2008)

Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST), In Thomas, L.: Labor und Diagnose - Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik, TH-Books, Frankfurt/Main, Kap. 1, S. 61-82.

VANNIER P., CARIOLET R. (1991)

Vaccination of pigs against Aujeszky's disease by the intradermal route using live attenuated and inactivated virus vaccines, Vet Microbiol, 26 (1-2), 11-23.

VIÑUELA-FERNÁNDEZ I., JONES E., WELSH E.M., FLEETWOOD-WALKER S.M. (2007)

Pain mechanisms and their implication for the management of pain in farm and companion animals, Vet J, 174 (2), 227-239.

WAGNER S., DUES G., SAWITZKY D., FREY P., CHRIST B. (2004)

Assessment of the biological performance of the needle-free injector INJEX using the isolated porcine forelimb, Br J Dermatol, 150 (3), 455-461.

WALD C. (2010)

Hygienische Alternative zum „Pieksen“ Land & Forst 33/2010, 38-39.

WEAVER S.A., AHERNE F.X., MEANEY M.J., SCHAEFER A.L., DIXON W.T. (2000)

Neonatal handling permanently alters hypothalamic-pituitary- adrenal axis function, behaviour, and body weight in boars, J Endocrinol, 164 (3), 349-359.

WIESNER E. (2000)

Lexikon der Veterinärmedizin, 4. Ausgabe. Enke im Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart.

WILLIAMS J., FOX-LEYVA L., CHRISTENSEN C., FISHER D., SCHLICHTING E., SNOWBALL M., NEGUS S., MAYERS J., KOLLER R., STOUT R. (2000)

Hepatitis A vaccine administration: comparison between jet-injector and needle injection, Vaccine, 18 (18), 1939-1943.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Herrn Prof. Heinritzi danken, dem diese Arbeit gewidmet ist. Er hat diese Doktorarbeit ermöglicht und mir ein Thema zugeteilt, das nicht besser meinen Erwartungen und Interessen hätte entsprechen können. Er hat mich in der Anfangsphase unermüdlich und mit viel Enthusiasmus bei der Versuchsplanung begleitet und hat mir durch seine Anteilnahme am Fortschritt der Arbeit, sogar noch in der Endphase, die größte Freude bereitet.

Vielen Dank auch an meinen Doktorvater unter deren Leitung und in deren Klinik bzw. Institut die Doktorarbeit angefertigt wurde. Herrn Prof. Dr. Ritzmann möchte ich besonders für die unkomplizierte Übernahme meiner Doktorarbeit von seinem Vorgänger Prof. Dr. Heinritzi danken. Prof. Dr. Hermanns und seinen Mitarbeitern möchte ich dafür danken, dass mir die nötigen Materialien zur Verfügung gestellt wurden und ich die institutseigenen Labore so eigenständig nutzen durfte.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen lieben Betreuerinnen Dr. Daniela Emrich und Dr. Susanne Zöls, die mir ununterbrochen, auch in ihrer Freizeit, als Ansprechpartnerinnen zur Seite gestanden sind, mir unzählige Anstöße zur Gestaltung des Versuches gegeben haben und mit ihren Verbesserungsvorschlägen zur Gestaltung meiner Doktorarbeit beigetragen haben. Vielen Dank für eure bedingungslose Unterstützung!

Dr. Benjamin Müller und insbesondere Dr. Matthias Eddicks möchte ich dafür danken, dass sie durch ihren Humor und ihre Geduld alle auftauchenden Schwierigkeiten relativiert haben und immer einen sachlichen Ausweg für kleinere oder größere „Katastrophen“ parat hatten. Außerdem haben sie mir die praktischen Fertigkeiten zur Ausführung der Versuche vermittelt und konnten stets mit nützlichen Ratschlägen aufwarten.

Vielen Dank auch an Herrn Prof. Dr. Kulozik vom Lehrstuhl für Lebensmittelverfahrenstechnik und Molkereitechnologie der Technischen Universität München für die großzügige Erlaubnis zur Benutzung des instituteigenen Labors. Auch seinen Mitarbeitern Herr Guyot und Frau Merkl möchte ich dafür danken, dass sie mir ihre Zeit zur Verfügung gestellt haben, um mich bei der Benutzung des Viskosimeters und der Datenauswertung anzuleiten.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Laffert und Herrn Praller von der Lehr- und Versuchsstation in Thalhausen der Technischen Universität München für ihre Kooperationsbereitschaft bedanken.

Frau Bärbel Garner möchte ich für die uneingeschränkt sorgfältige und zuverlässige Bearbeitung meiner zahlreichen Proben im Labor und für ihren aufopferungsvollen Einsatz in der arbeitsreichen Endphase der Probenbearbeitung danken. Auch den Mitarbeiterinnen aus dem Labor der Klinik für Wiederkäuer Frau Beyer, Frau Hartmann und Frau Altmann gilt mein diesbezüglicher Dank.

Meinen lieben Kolleginnen Lisa Zimmermann, Ute Halfmann und Julia Stadler möchte ich für ihren stets heiteren Zuspruch und ihre Unterstützung danken. Nicole Übel möchte ich besonders für die unersetzliche „Starthilfe“ in meinem Versuchsbetrieb, selbst noch in der belastenden Zeit vor der Abgabe ihrer eigenen Doktorarbeit, danken.

Frau Sauter-Louis danke ich für ihre Tipps und Hilfsmittel für die Durchführung der statistischen Auswertung.

Allen Rotationsstudenten, die mich bei der praktischen Ausführung der Versuche unterstützt haben und mit Interesse bei der Sache waren, gilt ebenfalls ein großer Dank.

Und zu guter Letzt möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern bedanken, die es mir ermöglicht haben, meinen Werdegang bis hin zur Doktorarbeit frei zu wählen und nach meinen Vorstellungen zu gestalten, die mir immer Rückhalt gegeben und mich immer unterstützt haben, nicht nur materiell, sondern in jeder Hinsicht durch ihre unendliche Güte.

Vielen Dank!