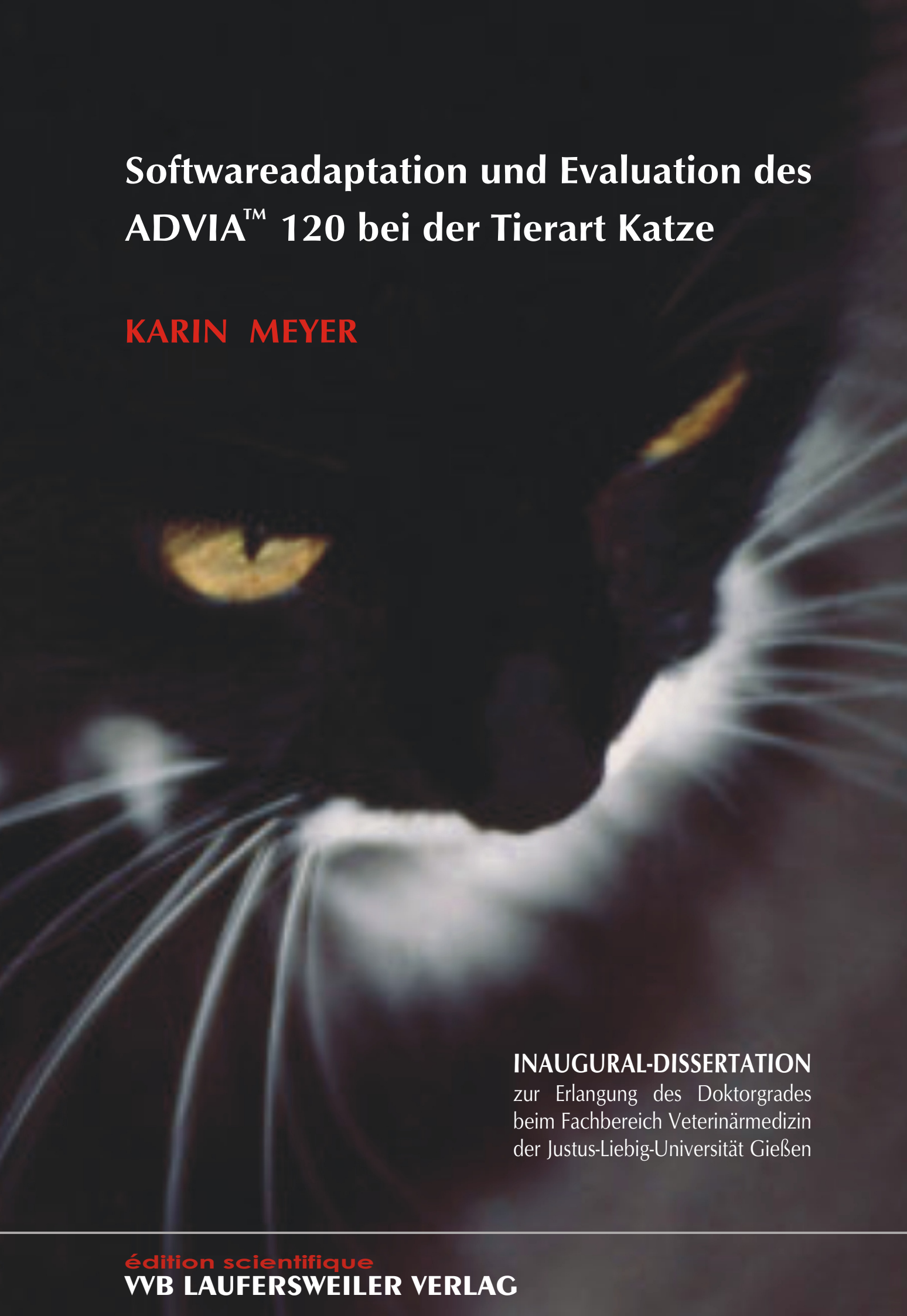




Softwareadaptation und Evaluation des ADVIA™ 120 bei der Tierart Katze

KARIN MEYER

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2005

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2005

© 2005 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Kleintiere
Innere Medizin und klinische Laboratoriumsdiagnostik
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: HDoz. Dr. A. Moritz

**Softwareadaptation und Evaluation des
ADVIA™ 120 bei der Tierart Katze**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Karin Meyer

Tierärztin aus Nastätten

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

1. Berichterstatter: HDoz. Dr. A. Moritz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Diener

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.05

Meinen Eltern

1 INHALTSVERZEICHNIS

1	INHALTSVERZEICHNIS	I
2	IM TEXT VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	V
3	EINLEITUNG	1
4	LITERATUR.....	2
4.1	Evaluation von Messgeräten.....	2
4.2	Manuelle Blutzellanalyse	6
4.2.1	Zählkammer.....	6
4.2.2	Blutausstriche	7
4.2.2.1	Panoptische Färbung (PAN).....	9
4.2.2.2	Peroxidase Färbung (POX).....	9
4.2.2.3	α -Naphthylacetat-Esterase Färbung (ANAE).....	10
4.3	Automatische Blutzellanalyse	10
4.3.1	Konduktometrisches Messprinzip	11
4.3.1.1	Sysmex F-800.....	12
4.3.1.1.1	Hämoglobinmessung und Leukozytenzählung	12
4.3.1.1.2	Erythrozyten- und Thrombozytenzählung	13
4.3.2	Optoelektronisches Messprinzip	13
4.3.2.1	ADVIA™ 120	14
4.3.2.1.1	Hämoglobinkanal	17
4.3.2.1.2	Erythrozyten-/ Thrombozytenkanal	17
4.3.2.1.3	Neuartige zweidimensionale Thrombozytenanalyse.....	23
4.3.2.1.4	Peroxidasekanal	26
4.3.2.1.5	Basophilenkanal	28
4.3.2.1.6	Retikulozytenzählung.....	30
4.3.2.1.7	Qualitätskontrollen und Kalibration	32
4.3.2.2	Technicon H*1	33
4.3.2.2.1	Erythrozyten-/ Thrombozytenkanal	33
4.3.2.2.2	Peroxidasekanal	34
4.3.2.2.3	Basophilenkanal	34
4.3.3	Quantitative Buffy Coat-Analyse (QBC®).....	34
4.4	Hämatologische Blutuntersuchung bei der Katze	35
4.4.1	Blutzellzählung.....	35
4.4.2	Blutzelldifferenzierung	39

4.4.3	Retikulozyten	42
5	MATERIAL UND METHODEN	44
5.1	Tiere	44
5.1.1	Alter	44
5.1.2	Geschlecht.....	44
5.1.3	Rasse.....	44
5.2	Blutprobenentnahme	44
5.3	Antikoagulanzen	45
5.4	Blutprobenverarbeitung	45
5.4.1	ADVIA™ 120	45
5.4.2	Technicon H*1	45
5.4.3	Sysmex F-800.....	45
5.4.4	Hämofigure A.....	46
5.4.5	Färbungen	46
5.4.5.1	Panoptische Färbung nach Pappenheim (PAN).....	46
5.4.5.2	Peroxidase Färbung (POX).....	47
5.4.5.3	α -Naphthyl-Acetat-Esterase Färbung (ANAE)	47
5.4.5.4	Retikulozytenfärbung (Supravitalfärbung).....	47
5.5	Versuchsprotokoll	48
5.5.1	Präzision	48
5.5.1.1	Präzision innerhalb der Serie.....	48
5.5.1.2	Präzision über verschiedene Serien hinweg.....	48
5.5.2	Linearität und Carry over beim ADVIA™ 120	48
5.5.2.1	Statistik Linearität und Carry over beim ADVIA™ 120	49
5.5.3	Methodenvergleich	49
5.5.4	Antikoagulanzenvergleich	50
5.5.5	Verlaufsuntersuchungen.....	50
5.5.6	2 D-Thrombozytenanalyse bei der Katze, ADVIA™ 120	50
5.6	Statistik	51
5.6.1	Varianzanalyse	51
5.6.2	Korrelationsanalyse	51
5.6.3	Matched t- Test/ Wilcoxon- Test.....	52
5.6.4	Signifikanz	52
5.6.5	Softwareadaptation und Evaluation des ADVIA™ 120	53

6	ERGEBNISSE	54
6.1	Präzision	54
6.1.1	Präzision innerhalb der Serie, ADVIA™ 120.....	54
6.1.1.1	Blutzellzählung.....	54
6.1.1.2	Blutzelldifferenzierung	56
6.1.1.3	Retikulozytenzählung.....	57
6.1.2	Präzision über verschiedene Serien hinweg	57
6.1.2.1	Blutzellzählung.....	58
6.1.2.2	Retikulozytenzählung.....	61
6.1.2.3	Blutzelldifferenzierung	61
6.2	Linearität und Carry over beim ADVIA™ 120	64
6.2.1	Linearität.....	64
6.2.2	Carry over	64
6.3	Methodenvergleich	65
6.3.1	Blutzellzählung.....	65
6.3.2	Blutzelldifferenzierung	72
6.3.3	Retikulozytenzählung.....	77
6.4	Antikoagulanzenvergleich	77
6.5	Verlaufsuntersuchungen	82
6.5.1	Blutzellzählung.....	82
6.5.2	Blutzelldifferenzierung	93
6.5.3	Retikulozytenzählung.....	98
6.6	2 D- Thrombozytenanalyse.....	100
7	DISKUSSION	103
7.1	Präzision	103
7.1.1	Präzision der Blutzellzählung.....	103
7.1.2	Präzision der Blutzelldifferenzierung.....	104
7.1.3	Präzision der Retikulozytenzählung.....	107
7.2	Linearität und Carry over des ADVIA™ 120	108
7.3	Methodenvergleich	108
7.3.1	Blutzellzählung.....	109
7.3.2	2 D-Thrombozytenanalyse.....	118
7.3.3	Blutzelldifferenzierung	122
7.3.4	Retikulozytenzählung.....	126
7.4	Antikoagulanzenvergleich	127

7.5	Verlaufsuntersuchungen	130
7.6	Fallbeispiele ADVIA™ 120.....	136
7.6.1	Veränderungen des roten Blutbildes	137
7.6.1.1	Anämie, normozytär- normochrom (Niereninsuffizienz).....	138
7.6.1.2	Anämie, hypochrom- makrozytär (FeLV- Infektion)	139
7.6.1.3	Anämie, hypochrom- makrozytär (Hämolyse).....	140
7.6.2	Normoblasten	142
7.6.3	Veränderungen des weißen Blutbildes	144
7.6.3.1	Neutrophile Granulozyten	145
7.6.3.1.1	Neutrophilie.....	145
7.6.3.1.2	Degenerative Linksverschiebung.....	145
7.6.3.1.3	Katze mit Panleukopenie	148
7.6.3.2	Eosinophile Granulozyten	149
7.6.3.2.1	Hypereosinophiles Syndrom	149
7.6.3.3	Lymphozyten	151
7.6.3.3.1	Lymphozytose.....	151
7.6.3.4	Fehlende Plausibilität: LeukoB/ LeukoP	151
7.6.4	Thrombozyten.....	153
7.6.4.1	Echte Thrombozytopenie/ Pseudothrombozytopenie	153
7.6.4.2	Aktivierungsgrad der Thrombozyten	154
7.6.5	Maligne Veränderungen	156
7.6.5.1	Lymphatische Leukämie (1).....	156
7.6.5.2	Lymphatische Leukämie (2).....	158
7.6.5.3	Malignes Lymphom, Grad V	160
7.6.5.4	Myelomonozytäre Leukämie	161
7.6.5.5	Myelodysplastisches Syndrom (MDS)	164
8	ZUSAMMENFASSUNG.....	167
9	SUMMARY	169
10	LITERATURVERZEICHNIS.....	171
11	DANKSAGUNG	190

2 IM TEXT VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

Abb.	=	Abbildung
ANAE	=	α –Naphthylacetat- Esterase Färbung
CHCM	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (<i>Cell Hemoglobin Concentration Mean</i>), gemessen
CV	=	Variationskoeffizient (<i>Coefficient of Variation</i>)
F800	=	Sysmex F-800
fl	=	Femtoliter
fmol	=	Femtomol
H*1	=	Technicon H*1
HB	=	Hämoglobin (<i>haemoglobin</i>)
HC	=	Haemoglobin Concentration
HDW	=	Hämoglobinverteilungsbreite (<i>Haemoglobin Distribution Width</i>)
HCT	=	Gerätehämatokritwert
ICSH	=	Internationales Komitee für Standardisierung in der Hämatologie (<i>International Committee for Standardization in Haematology</i>)
K ₃ EDTA	=	Kalium-Ethylendiamintetraessigsäure
Kap.	=	Kapitel
LUC	=	Große Peroxidase Negativ Gefärbte Zellen (<i>Large Unstained Cells</i>)
MCH	=	Mittlerer Zellulärer Hämoglobingehalt (<i>Mean Corpuscular Haemoglobin</i>)
MCHC	=	Mittlere Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (<i>Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration</i>), errechnet aus HB, MCV und RBC
MCV	=	Mittleres Erythrozytenvolumen (<i>Mean Corpuscular Volume</i>)
MN	=	Mononukleäre Zellen (<i>Mononucleated Cells</i>)
MPC	=	Mittlere Innere Bestandteile der Thrombozyten (<i>Mean platelet component</i>)
MPV	=	Mittleres Thrombozytenvolumen (<i>Mean Platelet Volume</i>)
n	=	Probenzahl
NCCLS	=	Nationales Komitee für Klinische Labor-Standards (<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>)
p	=	Signifikanz
PAN	=	Panoptische Färbung nach Pappenheim
PCV	=	Hämatokritwert (<i>Packed Cell Volume</i>), Mikrohämatokritzentrifuge
PDW	=	Thrombozyten Volumenverteilungsbreite (<i>Platelet Volume Distribution Width</i>)
PLT	=	Thrombozytenzahl (<i>Platelet Count</i>)
PMN	=	Polymorphnukleäre Zellen (<i>Polymorphnucleated Cells</i>)

POX	=	Peroxidase Färbung
QBC	=	Quantitative Buffy-Coat Analyse
r	=	Korrelationskoeffizient
RBC	=	Erythrozytenzahl (<i>(Red Blood Cells) Red Cell Count</i>)
RBC V	=	Red Blood Cell Volume
rd	=	relative Differenz
RDW	=	Erythrozyten(volumen)verteilungsbreite (<i>Red Cell Volume Distribution Width</i>)
s	=	Standardabweichung
S	=	Standardabweichung
SG	=	Sachverständigengremium
Tab.	=	Tabelle
μl	=	Mikroliter
WBC	=	Leukozytenzahl
$\bar{x}$	=	Mittelwert

3 EINLEITUNG

Moderne Hämatologiesysteme haben immer mehr Einzug in die veterinärmedizinische Diagnostik gefunden und sind heute im Routinebetrieb großer Laboratorien unentbehrlich. Die Automatisierung soll neben Zeit- und Kostenersparnis zu einer Steigerung der Qualität der Messergebnisse führen. Während manuelle Untersuchungsverfahren in höherem Maße neben methodischen Fehlern auch von der subjektiven Beurteilung des Untersuchers abhängig sind, wird von den automatischen Messmethoden durch standardisiertere Bedingungen eine Verbesserung der Analytik erwartet.

Inwieweit dieser Anspruch, von in der Regel für Humanblut konzipierten Automaten erfüllt werden kann, bedarf vor dem Einsatz in der Veterinärhämatologie einer sorgfältigen Überprüfung ihrer Tauglichkeit. Wie aus zahlreichen aus der Literatur bekannten Evaluationen von Hämatologiesystemen unterschiedlichster Messtechnik hervorgeht, sind diese aufgrund von tierartspezifischen Besonderheiten der Blutzellen für die Anwendung bei den einzelnen Tierarten unterschiedlich gut geeignet (MISCHKE et al., 1995; TVEDTEN und WILKINS, 1988). Insbesondere erweist sich für die Tierart Katze die automatisierte Blutzellzählung als schwierig (HART und NOLTE, 1991; MISCHKE et al., 1995; MORITZ et al., 1995; MORITZ, 2000; MORITZ und HOFFMANN, 1997; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN und WILKINS, 1988).

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht das von der Firma Bayer für Humanblut entwickelte Hämatologiesystem ADVIATM 120. Dieses auf dem optoelektronischen Messprinzip arbeitende Nachfolgemodell des alten H*-Systems zeichnet sich vor allem durch eine verbesserte Messtechnik, die zweidimensionale Thrombozytenanalytik und die Retikulozytenzählung aus.

Ziel der Untersuchungen ist es im ersten Schritt, die Software des Systems an die Tierart Katze zu adaptieren. Im zweiten Schritt soll die Tauglichkeit des vollautomatischen Blutanalysegerätes in Anlehnung an feste Standards (ENGLAND et al., 1994; VON RÜCKER et al., 1994) unter besonderer Berücksichtigung der Speziesbesonderheit der Katze überprüft werden. Hierbei wird vor allem auf die aus der Literatur hinlänglich bekannte Problematik der Thrombozytenanalytik und der Blutzelldifferenzierung eingegangen. Abschließend werden die Möglichkeiten und Grenzen der automatischen Blutzellzählung und -differenzierung anhand interessanter Fallbeispiele aufgezeigt.

4 LITERATUR

Die folgenden Kapitel geben einen Überblick über die der Evaluation zugrunde liegenden Standards und die verschiedenen manuellen und automatischen hämatologischen Untersuchungsmethoden. Das letzte Kapitel befasst sich mit der speziellen Problematik der Blutzellzählung und -differenzierung bei der Katze.

4.1 Evaluation von Messgeräten

Evaluation (frz. *evaluer* = abschätzen, berechnen, von lat. *valere* = stark sein, wert sein) bedeutet Analyse und Bewertung eines Sachverhalts, vor allem als Begleitforschung einer Innovation. In diesem Fall ist die Evaluation eine Effizienz- und Erfolgskontrolle zum Zweck der Überprüfung der Eignung eines in Erprobung befindlichen Modells (BROCKHAUS ENZYKLOPÄDIE, 1988).

Im Jahr 1963 wird erstmals in der Hämatologie ein internationales Komitee (ICSH, International Committee for Standardization in Haematology) einberufen, mit der Aufgabe, die Hämoglobinbestimmung zu standardisieren. Grund ist ein bis dahin „chaotischer Zustand“ bezüglich der Hämoglobinemessung (LEWIS, 1990). Ein von der ICSH ins Leben gerufenes Expertenteam etabliert zunächst die Cyanmethämoglobinmethode als Referenzstandard. Das Ziel einer Standardisierung in der Hämatologie ist der Erhalt vergleichbarer Präzision, Richtigkeit und Spezifität. Dies führt zu einer Harmonisierung von Resultaten zwischen verschiedenen Laboratorien in allen Ländern und auch zwischen verschiedenen Geräten oder Methoden innerhalb desselben Labors (LEWIS, 1990). Hierzu werden von dem ICSH nicht nur die Methoden, sondern auch das Material standardisiert. Standardisierte Materialien zur Überprüfung der Richtigkeit einer Messgröße sind Kalibratoren und Kontrollen.

Bei den standardisierten Methoden unterscheidet man eine definitive Methode, eine Referenzmethode, eine ausgewählte Methode und eine Routinemethode. Die definitive Methode ist richtig und spezifisch und liefert einen definitiven Wert als beste Annäherung an den wahren Wert. Die Referenzmethode liefert einen Wert, dessen Abweichung im Hinblick auf die medizinischen Erfordernisse vernachlässigbar klein ist (BESCHLUSS DES VORSTANDES DER BUNDESÄRZTEKAMMER, 1988). Die ausgewählte Methode für den Routinegebrauch zeigt eine ausreichende Richtigkeit und Präzision für den beabsichtigten

Zweck auf, ist praktikabel und einfach durchzuführen. Die einfache Routinemethode wird von dem ICSH nicht empfohlen (LEWIS, 1990). Mittlerweile sind für die Messung des Blutbildes folgende von dem ICSH bzw. dem Deutschen Institut für Normung (DIN) empfohlenen Referenzmethoden nach VON RÜCKER et al. (1994) derzeit national und international anerkannt:

- | | |
|------------------------------|---|
| - Hämoglobinmessung | Hämoglobincyanid-Methode, NCCLS-Protokoll H15-A, ICSH-Empfehlung in Clin. Lab, Haemat. 9 (ICSH, 1987), (DIN 58931, 1995) |
| - Hämatokritwert | Mikrohämatokrit-Methode NCCLS-Protokoll H7-A, NCCLS-Protokoll H7-A, ICSH-Empfehlung in J. Clin. Pathol. 33, 1 (1980) bzw. (1993), (DIN 58933-1, 1995) |
| - Erythrozytenkonzentration | Elektronische Impulszählung im Durchflusszytometer ICSH-Empfehlung in Clin. Lab. Haemat., 10, 203 (1988) DIN 58932-1, -2, -3, 58934-1 (1996, 1998, 1994, 1997) (DIN 58932-1, 1996), (DIN 58932-2, 1998; DIN 58932-3, 1994; DIN 58934-1, 1997) |
| - Leukozytenkonzentration | Elektronische Impulszählung im Durchflusszytometer nach Lyse der Erythrozyten ICSH-Empfehlung in Clin. Lab. Haemat., 10, 203 (1988), (DIN 58934-1, 1997), (DIN 58934-1, 1997), (ICSH, 1988) |
| - Thrombozytenkonzentration | Zählkammer oder elektronische Impulszählung im Durchflusszytometer nach Koinzidenzkorrektur ICSH, empfohlene Methode (1988B), (DIN 58934-1, 1997) |
| - Differenzialblutbild | Visuelle Differenzierung von 4 x 200 Zellen, (DIN 58934-1, 1997; NCCLS, 1992) |
| - Retikulozytenkonzentration | Elektronische Impulszählung nach Anfärbung der RNS bzw. DNS-Reste, Pure and Appl. Chem. 1992; 3: 1141 (von ICSH empfohlene Methode) (ICSH, 1992) |

Die Kalibration der Methoden, bis auf die Hämoglobinmessung, erfolgt mit Frischblut. Für die Kalibrierung von Hämoglobin gibt es ein stabiles Referenzmaterial (VON RÜCKER et al., 1994).

Basierend auf den Referenzmethoden und Kalibratoren wird 1994 in dem Protokoll des ICSH „Guidelines for the evaluation of blood cell analysers including those used for differential leucocyte and reticulocyte counting and cell marker applications“ (ENGLAND et al., 1994) die Vorgehensweise bei der Evaluation eines Gerätes vorgeschlagen. Im selben Jahr wird von der Sektion Hämatologie der Arbeitsgruppe Geräte-Evaluation und der Arbeitsgruppe Labor-Hämatologie der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie ein „Evaluationsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte“ veröffentlicht (ROWAN und ENGLAND, 1993; VON RÜCKER et al., 1994). Beide Protokolle knüpfen an das 1978 erstmals von dem ICSH vorgestellten „Protocol for type testing equipment and apparatus for haematological analysis“ (ICSH, 1978), den entsprechend der Geräteentwicklung erweiterten „Guidelines for the Evaluation of Instruments used in Haematology Laboratories“ (SHINTON et al., 1982) und dem „Protocol for the evaluation of automated cell counters“ (ICSH, 1984) an. In Anlehnung an die beiden aktuellen Protokolle des ICSH (1994) und VON RÜCKER et al. (1994), sollen hier kurz die wichtigsten Richtlinien zur Evaluierung von hämatologischen Geräten, die auch in dieser Arbeit Beachtung finden, vorgestellt werden:

- 1) Die Evaluation soll an mindestens drei medizinischen vom Gerätehersteller wirtschaftlich unabhängigen Einrichtungen mit personeller, finanzieller und fachlicher Kompetenz und ausreichendem Patientengut durchgeführt werden.
- 2) Die organisatorische Leitung der Geräte-Evaluation soll von einem Sachverständigen-Gremium (SG) getragen werden. Die Evaluatoren werden einer speziellen Schulung unterzogen.
- 3) Vor Beginn der Evaluation wird vom SG ein Prüfprotokoll mit Zeitplan erstellt.
- 4) Für zu evaluierende Geräte sollen deutschsprachige Handbücher vorliegen.
- 5) Das SG legt am Beginn einer Evaluation fest, welche definitiven Methoden, Vergleichsmethoden oder ausgewählte Methoden für die Beurteilung der Richtigkeit einer Messgröße notwendig sind. Ebenso wird vom SG festgelegt,

welche Kontrollmaterialien zur Überprüfung der Richtigkeit einer Messgröße verwendet werden dürfen.

- 6) Als Antikoagulanzen wird K₃EDTA empfohlen, Citrat und Heparin sind auch möglich. Bei Citrat muss allerdings das Verdünnungsverhältnis berücksichtigt werden. Die Blutproben dürfen nicht älter als vier Stunden sein und müssen bei einer Temperatur von 18-22°C gelagert werden. Vor der Messung der Proben sollten diese mindestens 20-mal mit der Hand sorgfältig überkopfgemischt werden oder es soll ein Inversionsmischer benutzt werden. Die Messung sollte bei 20-24°C erfolgen.
- 7) Bei der klinischen Evaluation sollten die hämatologischen Messgrößen bis an die vom Hersteller angegebene, sowie im Prüfprotokoll genannten Nachweisgrenzen untersucht werden.
- 8) Die bei der Evaluierung zu untersuchenden Zellarten, Zellkomponenten und Zellmerkmale ergeben sich aus den Angaben des Herstellers. Gibt der Hersteller an, dass das Gerät abnorme, pathologische und nichtpathologische Zellen, Zellkomponenten, Zellmerkmale im peripheren Blut erkennt, sollen diese Angaben überprüft werden. Hierbei wird untersucht, inwieweit das Gerät diese Veränderungen zum einen erkennt und zum anderen durch Warnsignale (flags) kenntlich macht.
- 9) Störungen seitens klinisch wichtiger und in der Literatur bekannter Interferenzen sollen überprüft werden.
- 10) Der Einfluss der Blutalterung auf die Messergebnisse soll in Verlaufsuntersuchungen überprüft werden. 72 Stunden werden parallel bei 4°C bzw. Raumtemperatur gelagerte Blutproben nach einem vorgegebenen Zeitplan untersucht.
- 11) Die Präzision soll innerhalb der Serie (within-batch precision) und über verschiedene Serien hinweg (between-batch precision) kontrolliert werden. Bei der Präzision innerhalb der Serie wird eine Blutprobe 25-mal direkt hintereinander gemessen. Die Präzision über verschiedene Serien hinweg wird aus einer dreifachen Messung verschiedener Blutproben berechnet.

- 12) Die Richtigkeit (accuracy) des Messvorgangs soll anhand von definitiven Methoden, Referenzmethoden oder ausgewählten Methoden ermittelt werden.
- 13) BROUGHTON et al. (1974) entwickelt eine Methode zur Überprüfung der Verschleppung (Carry over). Zur Untersuchung, ob sich sehr hoch und niedrig konzentrierte Proben gegenseitig beeinflussen, sollen zehnmal hintereinander drei Proben hoher Konzentration und drei Proben niedriger Konzentration gemessen werden.
- 14) Die Linearitätsprüfung soll die lineare Beziehung von hämatologischen Parametern und der jeweiligen Verdünnung überprüfen. Parameter, die durch die Verdünnung nicht beeinträchtigt werden sind z.B. MCV, MPV, RDW, MCH, und MCHC.
- 15) Nach Abschluss der Evaluation und statistischer Auswertung soll ein Evaluationsbericht erstellt werden.

Die Evaluierung soll sicherstellen, dass ein Gerät zum Zeitpunkt der Markteinführung die vom Hersteller angegebene Leistung erbringt (VON RÜCKER et al., 1994).

4.2 Manuelle Blutzellanalyse

Die Entdeckung der Blutzellen liegt schon weit über hundert Jahre zurück. Im Jahr 1674 beschreibt von Van Leeuwenhoek erstmals Erythrozyten. Knapp 100 Jahre später entdeckt Hewson (1773) die Leukozyten und im Jahr 1841 beschreibt Addison zum ersten Mal Thrombozyten. Die erste Zählkammer, der „Hämozytometer“ wird im Jahr 1873 entwickelt. Mit der Entwicklung einer Färbetechnik von Ehrlich 1877, mit der Zellkern und Zytoplasma einer Zelle unterschieden werden können, wird die Grundlage für das Differenzialblutbild gelegt (ZELMANOVIC et al., 1992). Da die Blutzellzählung in der Zählkammer und die Blutzelldifferenzierung im gefärbten Blutaussstrich lange Zeit die wichtigsten Methoden zur Blutzellanalyse sind, sollen diese im Folgenden kurz erläutert werden.

4.2.1 Zählkammer

Ist heutzutage die Verwendung der sehr fehleranfälligen (KRAFT und DÜRR, 1999; ROSS und KAPLOW, 1985; RÜMKE, 1985a) und zeitaufwendigen

Zählkammermethode in der tiermedizinischen Routinediagnostik nicht mehr üblich, so stellt sie in kleineren Praxen eine preisgünstige Alternative zur Blutzellzählung dar. Zudem wird sie bei bestimmten Fragestellungen als Referenzmethode zur Bewertung automatischer Blutzellanalysegeräte eingesetzt (MISCHKE et al., 1995; SPÄTH und WEBER, 1992; SUCHFORT, 1998).

Die heute am weitesten verbreitete Zählkammer ist die Neubauer- Zählkammer. Sie besteht aus einer dicken Glasplatte, auf der sich in der Mitte zwei durch Querrillen unterteilte Felder befinden. Diese sind 0,1 mm niedriger als das übrige Kammerniveau und tragen das eingeschliffene Zählfeld. Durch Auflegen des Deckglases auf die Glasplatte (Newtonsche Ringe) entsteht so ein genau definierter Hohlraum über den Zählfeldern, die Zählkammer (KRAFT und DÜRR, 1999). In der Zählkammer können Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten gezählt werden. Dazu muß das Blut in speziellen Mischpipetten je nach zu untersuchender Zellart unterschiedlich verdünnt werden (Erythrozytenzählung: 1: 200 mit Haymscher Lösung (JAIN, 1993; KRAFT und DÜRR, 1999); Leukozytenzählung 1: 10 mit Türk-Lösung (KRAFT und DÜRR, 1999; WIRTH, 1950), Thrombozytenzählung 1: 20 z.B. mit Thromboplus[®], Fa. Sarstedt (KRAFT und DÜRR, 1999)). Aus der mittleren Zahl der gezählten Zellen in den ausgezählten Planquadraten und dem Verdünnungsfaktor kann dann die Zellzahl l⁻¹ Blut errechnet werden.

4.2.2 Blutausstriche

Die visuelle Beurteilung von pathologischen automatisch erstellten Differenzialblutbildern ist auch heute noch ein unersetzliches Instrument in der hämatologischen Diagnostik, allerdings wird die routinemäßige manuelle Differenzierung von Blutausstrichen immer mehr durch Zählautomaten (Kap.2.3) ersetzt. Die manuelle Differenzierung von Blutausstrichen ist neben dem hohen Zeit-, Personal- und damit verbundenen Kostenaufwand auch sehr fehleranfällig (JAIN, 1993; KRAFT und DÜRR, 1999; THOMAS et al., 1989).

Man unterscheidet vermeidbare und unvermeidbare Fehler. Zu den vermeidbaren Fehlern zählen methodische Fehler, wie Fehler bei der Blutentnahme, der Wahl des Antikoagulanzen und der Wahl des zu mikroskopierenden Feldes (BACUS, 1973; BOVERI, 1939; GOLDNER und MANN, 1938; STIENE-MARTIN, 1998). Unvermeidbare statistische Fehler entstehen durch die in Relation zum Gesamtblut

nur sehr kleine Probenmenge, die unregelmäßige Verteilung der Leukozyten auf dem Ausstrich und die Differenzierung einer nur geringen Zellzahl (BARNETT, 1933; BENTLEY, 1990; KRAFT und DÜRR, 1999; RÜMKE, 1985b). RÜMKE und Mitarbeiter (1975) können zeigen, dass durch die Erhöhung der zu differenzierenden Zellen bei Wiederholungsbestimmungen die statistisch signifikanten Abweichungen kleiner werden (RÜMKE et al., 1975). Wertet man 400 statt 100 Zellen aus, verdoppelt sich die Präzision, bei einer Auswertung von 10.000 Zellen, verzehnfacht sich die Präzision sogar (RÜMKE, 1960; RÜMKE, 1977). Einen maßgeblichen Einfluss auf die Präzision des Differenzialblutbildes hat der tatsächliche Anteil der einzelnen Leukozytenpopulationen an der Gesamtzellzahl. So müsste man, um eine den Lymphozyten und Neutrophilen Granulozyten (diese stellen über 90 % der weissen Blutzellen dar) im 100 Zellen Differenzialblutbild vergleichbare Präzision zu erreichen, für Monozyten und Eosinophile Granulozyten 1000 Zellen und für Basophile Granulozyten 10.000 Zellen auswerten (ORNSTEIN et al., 1976). Aufgrund genannter Problematik fordert das National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1992) einen Standard für die Erstellung des Differenzialblutbildes. Dieser Standard H20-A verlangt von vier qualifizierten Untersuchern ein 200 Zellen Differenzialblutbild für die Evaluation eines Hämatologiesystems mit automatischer Zelldifferenzierung.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt in der irrtümlichen Zuordnung von Zellen zu einer falschen Leukozytenpopulation. Dieser Interpretationsfehler hängt in hohem Maße von der Erfahrung des Untersuchers ab. Das betrifft vor allem die Abgrenzung der Stabkernigen von den Segmentkernigen Neutrophilen Granulozyten und die Identifikation der Monozyten (BACUS, 1973; KOEPKE et al., 1985; KOEPKE, 1985).

Neben der Beurteilung von Leukozyten im Blutausstrich ist auch die Beurteilung von Erythrozyten und Thrombozyten von großer Bedeutung. So kann von einem geübten Untersucher die Zahl der Thrombozyten auf einem Ausstrich grob geschätzt werden. Durch Ermittlung des Verhältnisses von Thrombozyten pro 1000 Erythrozyten lässt sich bei zusätzlicher Bestimmung der Erythrozytenzahl die Thrombozytenzahl errechnen. Dieses Verfahren ist allerdings sehr störanfällig. In einer vergleichenden Untersuchung von Blutausstrich/ H*1 von TVEDTEN et al. (1988) entspricht ein Thrombozyt in einem Gesichtsfeld ca. 20.000 Thrombozyten μl^{-1} , WEISS (1984) gibt hier einen Wert von 15.000 μl^{-1} an (TVEDTEN et al., 1988; WEISS, 1984). Mit einer Korrelation von $r = 0,937$ korreliert die geschätzte Zahl von Thrombozyten erstaunlicherweise sehr gut mit der automatisch gemessenen Zahl. Ein Ergebnis von

8-29 Thrombozyten/ Gesichtsfeld lässt eine normale Thrombozytenzahl des Hundes erwarten (TVEDTEN et al., 1988).

Zur Erythrozytenzählung sind Blutausstriche aufgrund der sehr variablen Ausstrichdicke schlecht geeignet (TVEDTEN und HAINES, 1994). Zudem besteht kein Zweifel, dass bei der quantitativen Beurteilung von z.B. Hypochromasie oder bei der Differenzierung von Mikro- und Makrozytose Geräte zuverlässiger sind, als das menschliche Auge (FAIRBANKS, 1971; LEWIS, 1990).

Für die manuelle Differenzierung der Leukozyten stellt die panoptische Färbung die zuverlässigste Methode dar (HALLMANN, 1980). Durch den Einsatz von zytochemischen Spezialfärbungen (POX, ANAE) wird eine Verbesserung der Unterscheidung von sich ähnelnden Leukozyten erreicht (ORNSTEIN et al., 1976).

4.2.2.1 Panoptische Färbung (PAN)

Im englischsprachigen Raum wird vor allem die Wright-Färbung verwendet, währenddessen im deutschsprachigen Raum die Färbung nach Pappenheim (modifizierte May-Grünwald-Färbung) die gebräuchlichste panoptische Methode ist. Die Zellbestandteile werden entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften (Säuregehalt) zuerst mit saurer (roter) und dann mit basischer (blauer) Färbelösung gefärbt. Erythrozyten und saure Leukozytengranula färben sich unterschiedlich intensiv rot. Die Kerne von Leukozyten und Normoblasten, basische Leukozytengranula und Thrombozyten werden durch die basische Färbelösung verschieden intensiv blau angefärbt.

4.2.2.2 Peroxidase Färbung (POX)

Mit Hilfe dieser Färbung wird der unterschiedliche Peroxidasegehalt im Zytoplasma der Leukozyten nachgewiesen. Als Speziesbesonderheit bei der Katze zeigen nur die Neutrophilen Granulozyten eine positive Reaktion, nicht aber die Eosinophilen Granulozyten (JAIN, 1968; KELLER, 1986). Monozyten und Lymphozyten sind peroxidasenegativ (JAIN, 1968; JAIN, 1970).

Zytochemisch katalysiert die zelleigene Peroxidase in Anwesenheit von H_2O_2 die Oxidation eines geeigneten Donators (4-Chloro-1-naphthol). Hierbei entsteht ein schwarzbrauner unlöslicher Farbstoff (MERCK, 1990a). Die Intensität der schwarz-

braunen Färbereaktion zeigt den Reifegrad der Neutrophilen Granulozyten an. Eine wichtige Rolle spielt die Peroxidasefärbung bei der Differenzierung myeloischer Leukämien.

4.2.2.3 α -Naphthylacetat-Esterase Färbung (ANAE)

Diese Färbung basiert auf der unterschiedlichen α -Naphthylacetat-Esterase-Aktivität in den Blutzellen. Die ANAE positiv reagierenden Monozyten und Thrombozyten zeigen eine deutliche zusammenhängende Rotfärbung im Zytoplasma. Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten sind ANAE negativ. Bei den Lymphozyten weisen die T-Lymphozyten zum Teil punktförmige rotbraune Granula auf (JAIN, 1993; KELLER, 1986).

Die α -Naphthylacetat-Esterasen katalysieren die hydrolytische Spaltung von 1-Naphthylacetat zu Essigsäure und 1-Naphtol, das mit einem Diazoniumsalz zu einem wasserunlöslichen, rotbraunen Azofarbstoff reagiert (MERCK, 1990b). Diese Färbung dient der Unterscheidung von Lymphozyten und Monozyten und der Differenzierung von Leukämien.

4.3 Automatische Blutzellanalyse

In der Veterinärmedizin gewinnt die automatisierte Erstellung von Blutbildern zunehmend an Bedeutung (MISCHKE et al., 1995; MORITZ, 2000; TVEDTEN und WILKINS, 1988; WEISER, 1983). Schon in der Mitte der 30er Jahre gibt es erste Ansätze zur automatischen Blutzellzählung mit Hilfe einer Dunkelfeldoptik. Einen Durchbruch in der Technik der vornehmlich für Humanblut entwickelten automatisierten Blutzellzählung wird in den 50er Jahren und Anfang der 60er Jahre mit der Einführung von Durchflusssytometern errungen. Mit zunehmender Verbesserung der Messtechnologie können neben den Parametern WBC, RBC, HB und den errechneten Erythrozytenindizes (MCV, MCH, MCHC) auch die Parameter PLT, RDW, PDW und MPV bestimmt werden. Schließlich wird es in den 70er Jahren möglich, die Leukozyten mit Hilfe einer zytochemischen Färbung in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten (Neutrophile, Eosinophile, Basophilie) zu differenzieren. Die Messverfahren werden in den letzten Jahren zunehmend verfeinert (MORITZ, 2000). Hier unterscheidet man generell die Durchfluss- und die Depositionsverfahren. Bei den Durchflussverfahren kommen das konduktometrische

(Widerstands-), das optoelektronische (Streulicht und Absorbimetrie) und das Fluoreszenzverfahren zum Einsatz. Hier durchströmt eine Blutverdünnung einen Messfühler (Transducer). Beim Durchtritt jeder Zelle wird ein Messsignal induziert, das der Signalverarbeitung zugeführt wird (EDER und FRITSCHKE, 1986). Die den Durchflussverfahren gegenüber stehenden in den 70er Jahren entwickelten und zu den Depositionsverfahren gehörende pattern recognition (Mustererkennung) findet vor allem in der Differenzierung von Leukozyten Anwendung. Bei dem zur Zeit nicht mehr auf dem Markt befindlichen Gerät Microx 70 der Firma Omron wird die auf einen Objektträger abgeschiedene und zu analysierende Zellsuspension mit Hilfe eines computergestützten Bildanalyse-Systems differenziert (MORITZ, 2000).

Die zwei heute am häufigsten vertretenen Messverfahren, das optoelektronische und das konduktometrische Messprinzip, sowie das QBC-System sollen im Folgenden kurz erläutert werden. Im Anschluss werden die in der Arbeit verwendeten Referenzgeräte beschrieben.

4.3.1 Konduktometrisches Messprinzip

Das erste kommerzielle und erfolgreiche Blutzellanalysegerät, Model A Coulter Counter, wurde 1956 eingeführt (ZELMANOVIC et al., 1992).

Das konduktometrische Gerät arbeitet mit dem Widerstandsmessprinzip oder auch nach seinem Erfinder benannten „Coulter-Prinzip“. Das mit einer Elektrolytlösung stark verdünnte Blut wird durch eine sehr kleine Messöffnung zwischen zwei Elektroden mit angelegter Gleichspannung gesaugt. Beim Durchtritt einer Zelle durch die Messöffnung kommt es zu einer kurzzeitigen Änderung des elektrischen Widerstandes und damit auch zu einer impulsartigen Änderung der Stromstärke (EDER und FRITSCHKE, 1986). Dieser Impuls ist in seiner Höhe vom Volumen und in seiner Breite von der Durchflusszeit der Zelle durch die Kapillare abhängig (WEBER, 1992). Dies ermöglicht bei geeigneter Schwellenwerteinstellung nicht nur eine Bestimmung der Zellzahl sondern auch des Partikelvolumens (EDER und FRITSCHKE, 1986). Die Empfindlichkeit der Messanordnung ist vom Verhältnis des Zellvolumens zum Volumen der Kapillare abhängig. Daher ist es sinnvoll, eine Kapillare zu verwenden, deren Durchmesser nur wenig größer ist als das der Zelle (WEBER, 1992).

Weiteres zur Methodik des mit Hilfe des Coulter-Prinzips arbeitenden und in der vorliegenden Arbeit verwendeten Referenzgerätes Sysmex F800 wird im folgenden Kapitel behandelt.

4.3.1.1 Sysmex F-800

Ein Referenzgerät im Rahmen dieser Untersuchungen stellte das halbautomatische Hämatologiesystem Sysmex F-800 (Fa. TOA Medical Electronics, Hamburg) dar, welches auf der Grundlage des Widerstandsmessprinzips arbeitet. Von jeder Blutprobe werden, wie nachfolgend erläutert, mit Hilfe des Autodilutors AD-260 zwei Messverdünnungen hergestellt. Die erste Verdünnung dient der Leukozytenzählung und Hämoglobinbestimmung, die zweite der Erythrozyten- und Thrombozytenzählung. Das Gerät wird entsprechend den Herstellerangaben kalibriert (Hämoglobinkonzentration, Hämatokritwert) und gewartet.

4.3.1.1.1 Hämoglobinmessung und Leukozytenzählung

Zur Herstellung der ersten Verdünnung werden mit Hilfe des Autodilutors 0,02 ml der Blutprobe angesaugt und mit 9,94 ml der Verdünnungslösung (Cellpack PK 30L, Fa. TOA Medical Electronics, Hamburg) im 1. Messbecher vermischt (Mischungsverhältnis 1: 500). Anschließend werden drei Tropfen eines Lysemittels (Quicklyser-II, Fa. TOA Medical Electronics, Hamburg) hinzugefügt.

Durch diesen Zusatz werden die bei der Leukozytenzählung störenden Erythrozyten lysiert und Hämoglobin freigesetzt. Dieses kann mit einer modifizierten international standardisierten Cyanmethämoglobinmethode folgendermaßen bestimmt werden.

Das Hämoglobin oxidiert zu Methämoglobin, das mit Kaliumcyanid des Lysemittels einen stabilen Cyanmethämoglobinkomplex bildet. Dessen Konzentration kann photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen werden.

Der Lysemittel lysiert nicht nur die Erythrozyten, sondern zerstört auch gleichzeitig die Zellmembranen der Leukozyten. Bei der Leukozytenzählung nach dem Widerstandsmeßprinzip erzeugen daher nur die Kerne ein Signal. Die Diskriminierung der Leukozyten erfolgt mit Hilfe dreier Schwellenwerte. Der untere Schwellenwert liegt bei 30 – 60 fl und der obere Schwellenwert bei 300 fl. Alle Partikel, die einen Impuls in diesem Meßbereich erzeugen, werden als Leukozyten

gezählt. Zusätzlich zur Leukozytenzahl kann von dem Gerät aufgrund der unterschiedlichen Zellkerngröße eine Differenzierung in große (Granulozyten und Monozyten) und kleine (Lymphozyten) Leukozyten vorgenommen werden. Hierzu wird der dritte mittlere Diskriminator automatisch in das Tal zwischen diesen beiden Populationen gesetzt (Sysmex F-800, Operator's manual). Aufgrund des unimodalen Leukogramms ist die Erstellung eines Semidifferenzialblutbildes bei der Katze nicht möglich (MISCHKE et al., 1995; SUCHFORT, 1998).

4.3.1.1.2 Erythrozyten- und Thrombozytenzählung

Zur Herstellung der 2. Messverdünnung werden mit Hilfe des Autodilutors vor Zugabe des Lysemittels 0,1 ml der Leukozyten/ Hämoglobinverdünnung erneut mit 9,94 ml Reagenzlösung verdünnt (Mischungsverhältnis 1: 50.000).

Die Messung der Erythrozyten und Thrombozyten erfolgt in einem 2. Meßkanal mittels Impedanzmethode. Die Blutzellen werden automatisch mit Hilfe zweier Schwellenwerte diskriminiert. Alle Teilchen die Signale zwischen 2 - 6 fl und 12 - 30 fl liefern, werden als Thrombozyten gezählt und Partikel, die Impulse zwischen 25 -75 fl und 200 – 250 fl liefern, als Erythrozyten. Falls erforderlich ist ein manuelles Verschieben der Diskriminatoren möglich.

Die Messung des Hämatokritwertes wird elektronisch auf der Grundlage der kumulativen Impulshöhensummierung ermittelt. Hier werden die Volumina der innerhalb der Schwellenwerte gezählten Erythrozyten addiert und zum Volumen der Messverdünnung ins Verhältnis gesetzt.

Die Erythrozytenindizes MCV, MCH und MCHC errechnet das Gerät aus dem Hämatokritwert, der Erythrozytenzahl und dem Hämoglobingehalt. Die Thrombozytenindizes MPV und PDW werden ebenfalls vom Gerät mittels Partikelverteilungsanalyse ermittelt (Sysmex F-800, Operator's manual).

4.3.2 Optoelektronisches Messprinzip

Beim optoelektronischen Messprinzip werden zwei durch die Zellen verursachte Messgrößen (Streulicht und Absorption) optisch erfasst. Erzeugt werden die Signale bei Durchfluss der verdünnten Blutprobe nach hydrodynamischer Zellfokussierung und isovolumetrischer Aufkuglung (Erythrozyten, Thrombozyten) durch eine

Küvette, die seitlich von einem eng gebündelten Licht- oder Laserstrahl beleuchtet wird (EDER und FRITSCH, 1986). Der Einsatz von Laserlicht im Vergleich zu Halogenlicht ist unproblematischer. Währenddessen jede Änderung an der Halogenlampe, der Küvettenposition und der Strömung des Probenstromes eine Dejustierung bedeutet und zu einer scheinbaren Verkleinerung der Zellen führt, liefert der Laser nahezu parallele, eng begrenzte Strahlenbündel hoher Energie. Er wird vor allem dort eingesetzt, wo die Streulichtsignale klein sind (WEBER, 1992).

Die Blutzellen streuen den größten Anteil des einfallenden Lichtes in einem Winkel von 0 - 15° (ZELMANOVIC et al., 1992), wobei das Kleinwinkelstreulicht (2 - 3°) Informationen über die Zellgröße und das Großwinkelstreulicht (5 - 15°) Informationen über die intrazelluläre Beschaffenheit der Zelle liefert.

Neben der Lichtstreuung wird ein Teil des Lichts vom Zellinhalt absorbiert. Diese Eigenschaft macht man sich bei der Leukozytendifferenzierung zu nutze. Hier wird die Streulichtmessung (Zellvolumen) mit der Messung der Absorption der zytochemisch gefärbten Leukozyten kombiniert (WEBER, 1992).

Die Streulichtsignale werden von einem lichtempfindlichen Empfänger (Photomultiplier) erfasst, die von der Zelle absorbierte Lichtmenge wird von einer Photodiode gemessen (DOTSON, 1998; EDER und FRITSCH, 1986).

Das erste mit dem optoelektronischen Messprinzip arbeitende Gerät, der SMA4/ A Autocounter, wurde 1965 vorgestellt. Das Hämatologiesystem CELL-DYN R-3500 (Abbott, Wiesbaden) arbeitet mit einer Kombination von optoelektronischem und Widerstandsmessprinzip. Im Folgenden soll näher auf die Messtechnik, der beiden mit Hilfe des optoelektronischen Messprinzips arbeitenden und in der Arbeit verwandten Geräte (ADVIATM 120, H*1), eingegangen werden.

4.3.2.1 ADVIATM 120

Das Hämatologiesystem ADVIATM 120 der Firma Bayer, Fernwald ist ein vollautomatisches Blutanalysegerät und das Nachfolgemodell der bekannten H-Systeme. Es zeichnet sich neben einer verbesserten Messtechnik (UFC- Technologie) und einer bedienerfreundlicheren Anwendung durch eine erweiterte Blutzellanalytik aus. Neben dem kleinen oder großen Blutbild können nun auch die Retikulozyten inklusive Subklassifizierung und Retikulozytenindizes

analysiert und neue Thrombozytenparameter (z.B. MPC, mean platelet component) bestimmt werden. Durch interne Plausibilitätskontrollen werden die Resultate des roten und weißen Blutbildes überprüft (MCHC, Leuko B). Die Messtechnik beruht auf dem optoelektronischen Messprinzip, bei dem die Blutzellen mit Hilfe der Doppel-Laser-Streulichtmessung (Erythrozyten, Thrombozyten, Retikulozyten), der Halogenstreulichtmessung (Leukozytenvolumen) und der Absorptionsmessung (Leukozyten-differenzierung, Retikulozyten) analysiert werden.

Folgende Testanforderungen stehen zur Verfügung: CBC (kleines Blutbild), CBC/ Diff (kleines Blutbild, Differenzialblutbild), Reti (Retikulozyten), CBC/ Diff/ Reti (kleines Blutbild, Differenzialblutbild, Retikulozyten) und CBC/ Reti (kleines Blutbild, Retikulozyten). Der Reagenzverbrauch entspricht daher nur der jeweiligen Testanforderung. In einer Stunde können 120 große Blutbilder bestimmt werden. Bei gleichzeitiger Retikulozytenanforderung reduziert sich der Probendurchsatz auf 74 Analysen in der Stunde.

Die Steuerung des Gerätes erfolgt mit Hilfe der Multi-Species-Software (derzeit aktuelle Version 1.1.08-MS). Damit ist gegenüber den H-Systemen eine wesentliche Vereinfachung und Verbesserung in der Bedienung, dem Qualitätskontrollmanagement, der Datenverarbeitung und dem Reagenzmanagement erreicht. Der Barcode auf den Reagenzien, Kontrollen und Kalibratoren enthält alle wichtige Daten und kann mit dem Barcodelesegerät eingelesen werden. Der ADVIA™ 120 überwacht den Reagenzverbrauch individuell nach den vorgegebenen Warnkriterien.

Für jede Messung werden 155 µl EDTA- Blut benötigt. Es können auch Citrat- und Heparinblut verwendet werden (KOSANKE, 1999). Das Blut kann zum einen manuell aus dem offenen Röhrchen, dem geschlossenen Röhrchen oder automatisch mit dem Rack- System, welches sich vor allem für große Probenzahlen eignet, vom Gerät aspiriert werden. Die Probennummern können manuell oder auch automatisch mit Hilfe des Barcode-Lesegerätes eingescannt werden.

Die gesamte hämatologische Analytik wird in dem sogenannten UFC- Block (Unified Fluidic Circuit) zusammengefasst. In diesem Acrylblock befinden sich alle Proben- und Reagenzkanäle. Diese technische Neuerung im Vergleich zu den H-Systemen bedeutet den Wegfall aller wartungsanfälliger Quetschventile und Silikonschläuche. Die Anzahl der Bauteile reduziert sich auf weniger als 800 von ca. 2500 bei den H- Systemen.

Die Analyse in den verschiedenen Messkanälen, dem Hämoglobinkanal, dem Erythrozyten- und Thrombozytenkanal, dem Peroxidasdifferenzierungskanal, dem Basophilenkanal, und dem Retikulozytenkanal werden im Folgenden erläutert. Nach der Analyse wird das Blut-/ Reagenzgemisch in dem Abfallcontainer entsorgt und die benutzten Messkanäle werden automatisch gespült. Die Ergebnisdarstellung auf dem Bildschirm, der sogenannte run screen, kann vom Benutzer je nach Testanforderung im Gegensatz zu den H-Systemen selbst konfiguriert werden. Die graphischen Darstellungen sind farbig dargestellt. Im Folgenden ist beispielhaft der Ergebnisausdruck einer Katze abgebildet.

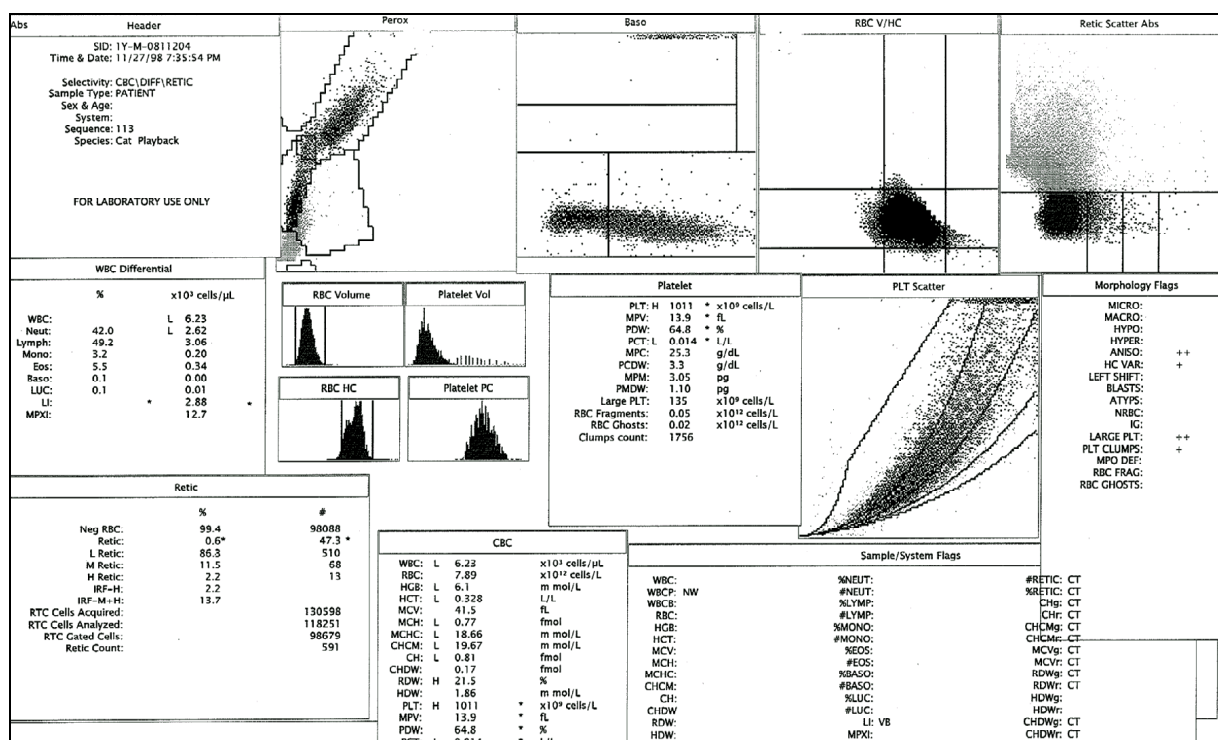


Abbildung 1: Ergebnisausdruck ADVIA™ 120 von Katze Nr. 204

4.3.2.1.1 Hämoglobinkanal

Im Hämoglobinkanal wird die Gesamthämoglobinkonzentration einer Blutprobe wie in den H- Systemen photometrisch nach der modifizierten ICSH- Methode bei einer Wellenlänge von 546 nm bestimmt (KOSANKE, 1999). Das zur Analyse notwendige Reagenz ADVIATM 120 HB enthält eine oberflächenaktive Substanz und Cyanid in stark alkalischer (pH11,3) Boratlösung.

Durch diese oberflächenaktive Substanz werden die roten Blutzellen lysiert und Hämoglobin freigesetzt. Anschließend wird durch das Zusammenspiel der oberflächenaktiven Substanz und dem hohen pH-Wert das zwei- und dreiwertige Eisen aus dem Globin freigesetzt. Das zweiwertige Eisen wird dann anschließend zu dreiwertigem Eisen luftoxidiert. Das dreiwertige Eisen bildet nun mit dem Cyanid einen Komplex, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann. Da mit dieser modifizierten Methode das Cyanid nicht erst in das Methämoglobin diffundieren muss -der limitierende Faktor in dieser Reaktion-, sondern sich direkt an das dreiwertige Eisen binden kann, ist die Reaktionszeit auf ca. 3– 15 Sekunden reduziert (ZELMANOVIC et al., 1992).

4.3.2.1.2 Erythrozyten-/ Thrombozytenkanal

Die Messung der Erythrozyten und Thrombozyten erfolgt simultan, wie in den H- Systemen, mittels Laserlichtstreuung in zwei definierten Winkelbereichen (2 - 3° und 5 - 15°) in einem Messkanal (TYCKO et al., 1985).

In einer Blutprobe eines gesunden Tieres werden während eines Messvorgangs etwa 50.000 Erythrozyten und etwa 3.000 Thrombozyten simultan gezählt und morphologisch beurteilt.

In einem ersten Reaktionsschritt erfolgt, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, die isovolumetrische Aufkugelung der Zellen (KIM und ORNSTEIN, 1983). So wird sichergestellt, dass jede gleich große Zelle auch ein gleiches Streulichtsignal (Niedrigwinkelsignal) erzeugt. Die Aufkugelung der Thrombozyten erfolgt durch das Antikoagulanzen EDTA selbst, die Erythrozyten werden durch das im ADVIATM 120 RBC/ PLT Reagenz enthaltene Laurylsulfat (SDS) aufgequellert. Fixiert werden die Zellen mit Glutaraldehyd. Die so in isotonem Milieu präparierten Zellen gelangen nun in den Messkanal.

Im Messkanal wird in der Flusszelle durch die sogenannte hydrodynamische Zellfokussierung eine Zellvereinzelung erreicht. Das geschieht durch konische Verengung des Probenstroms und des umgebenden Mantelstroms. Da sie unterschiedlich schnelle Fließgeschwindigkeiten aufweisen, findet keine Vermischung beider Ströme statt (laminare Strömung). Der Mantelstrom wird vom ADVIA Reagenz Sheath Rinse gebildet und stellt ein optimales transparentes Medium dar, so dass der Probenstrom ohne Beeinträchtigung fokussiert werden kann. Das Prinzip der hydrodynamischen Zellfokussierung veranschaulicht die folgende Abbildung einer Flusszelle.

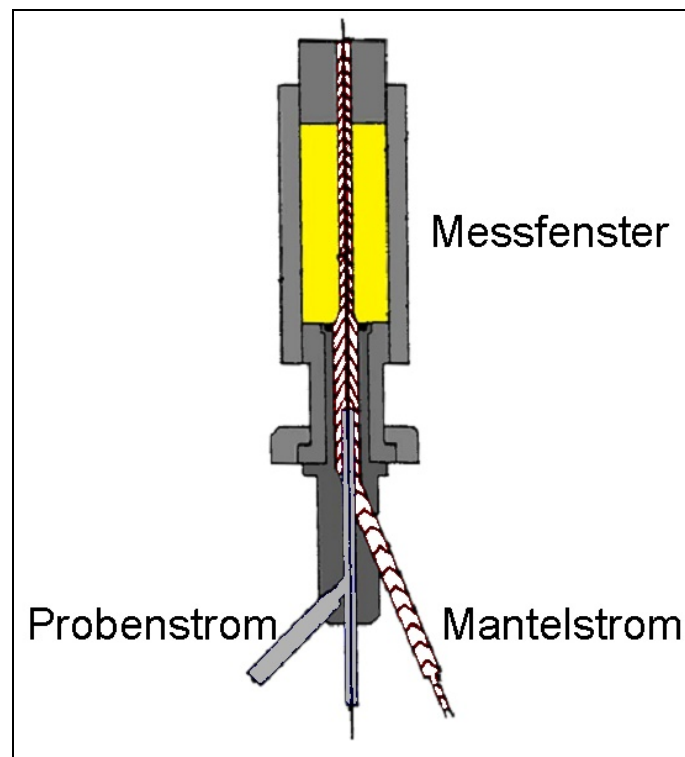


Abbildung 2 : Schema hydrodynamischer Zellfokussierung in der Flusszelle im Messkanal ADVIA™ 120 (modifiziert nach ADVIA™ 120 Help Operator's Guide)

Der große Vorteil der Ummantelung des Probenstroms liegt –neben der Zellvereinzelung– darin, dass die Probe nicht mit der Wandung in Berührung kommt. Es können selbst größere Teilchen wie Agglutinate die Flusszelle passieren, ohne eine Verstopfung zu verursachen.

Im Messfenster trifft der Laserstrahl, der von einer Laserdiode mit einer Wellenlänge von 670 nm erzeugt wird, auf die vereinzelt Zellen und erzeugt Streulichtsignale in einem großen Winkelbereich.

In zwei Winkelbereichen und zwar im Niedrigwinkelbereich von $2 - 3^\circ$ und im Hochwinkelbereich von $5 - 15^\circ$ wird das Streulicht von Detektoren registriert und verarbeitet (JAIN, 1993). Das Niedrigwinkelsignal ist dem Zellvolumen und das Hochwinkelsignal dem Brechungsindex proportional, der wiederum der Dichte (Hämoglobingehalt) proportional ist. In der folgenden Abbildung ist das optoelektronische Messprinzip dargestellt.

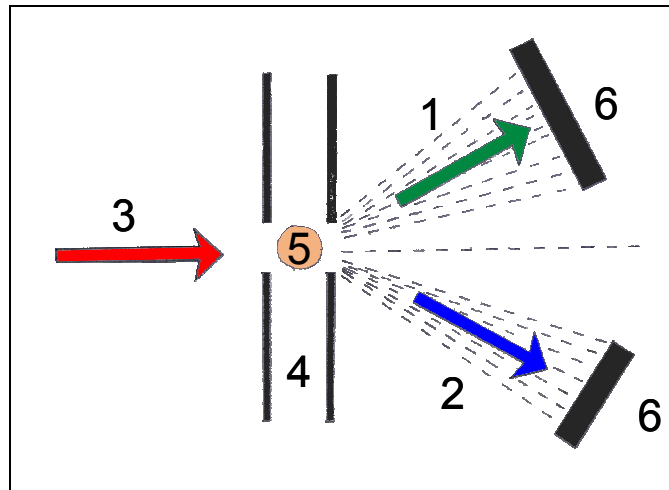


Abbildung 3: Optoelektrisches Messprinzip, Laserstreulicht ADVIA™ 120

1= Niedrigwinkel- Signal $2 - 3^\circ$, Zellgröße

2= Hochwinkel- Signal $5 - 15^\circ$, intrazelluläre Beschaffenheit

3= Laser

4= Flusszelle mit Messfenster

5= Blutzelle

6= Detektoren

Im Erythrogramm werden die Ergebnisse der Laserstreulichtmessung wie folgt graphisch dargestellt.

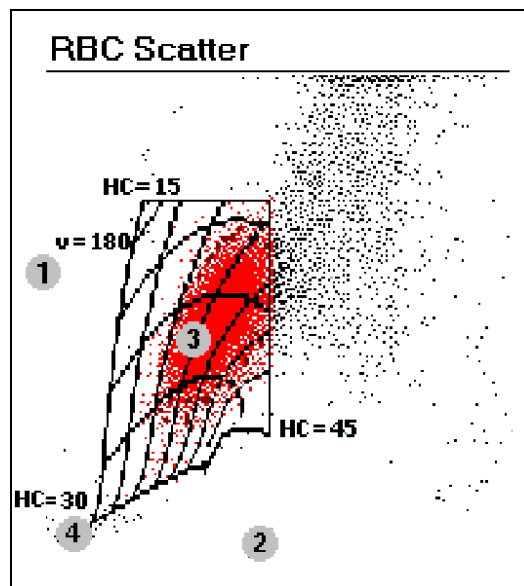


Abbildung 4: Erythrogramm, (RBC Scatter)
 1= Y-Achse= Niedrigwinkelsignal 2 - 3°
 2= X-Achse= Hochwinkelsignal 5 - 15°
 3= Mie-Map (Punktwolke~Erythrozytenbereich)
 4= Thrombozytenbereich
 (modifiziert nach ADVIA™ 120 Help Operator's Guide)

In dem abgebildeten RBC Scatter werden die Signale des Niedrigwinkels (Volumen) auf der Y- Achse, die Signale des Hochwinkels (Dichte) auf der X- Achse aufgetragen. Die darin eingezeichneten Linien werden mittels Mie- Theorie berechnet. Das heißt, Zellen mit gleichen Volumina und gleichem Brechungsindex werden gruppiert.

Die Kalibration des Systems erfolgt durch die Verwendung einer wasserunlöslichen Tröpfchenemulsion einer Substanz mit hoher Reinheit und genau definiertem Brechungsindex. Verwendung finden hierfür Alkane wie Heptan, Nonan oder Dodecan, die mit ihrem Brechungsindex und ihrem Volumen im Bereich der Erythrozyten liegen (KOSANKE, 1999). Die eine Linienschar stellt die Iso- Volumen- Linien, die andere die Iso-Hämoglobin- Linien dar. Die Punktwolke im Zentrum der sogenannten Mie-Map beinhaltet die Erythrozyten. Der Messbereich erfasst Erythrozyten mit einem Volumen zwischen 30 – 60 fl und einer Hämoglobinkonzentration zwischen 15 – 45 g dl⁻¹. Am Ursprung der Mie-Map befindet sich der Thrombozytenmessbereich.

Eine übersichtlichere Form der Darstellung der direkt gemessenen Parameter der Erythrozytenanalyse ist in der folgenden Abbildung, dem sogenannten TIC TAC TOE zu erkennen.

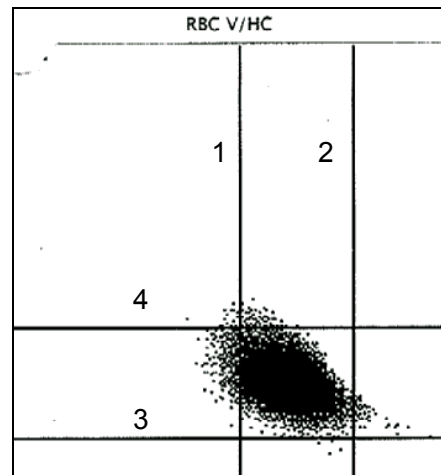


Abbildung 5: TIC TAC TOE, Erythrogramm (RBC V/ HC) von Katze Nr.184, ADVIA™ 120

- 1= Schwellenwert hypochrom-normochrom
- 2= Schwellenwert normochrom-hyperchrom
- 3= Schwellenwert mikrozytär-normozytär
- 4= Schwellenwert normozytär-makrozytär
- X-Achse= Hämoglobingehalt
- Y-Achse= Zellgröße

Im oben abgebildeten TIC TAC TOE wird auf der X- Achse der Hämoglobingehalt und auf der Y- Achse das Volumen aufgetragen. Im mittleren Feld befinden sich normozytär- normochrome Erythrozyten. Die Schwellenwerte werden tierartspezifisch von der Software festgelegt. Neben der graphischen Darstellung wird der Untersucher durch Beflagung auf mikro- oder makrozytäre, bzw. hypo- und hyperchrome Erythrozyten und Anisozytose aufmerksam gemacht. Weitere graphische Darstellungen sind die Erythrozytenverteilungskurve und Hämoglobinverteilungskurve. Beide Kurven entsprechen bei einer gesunden Katze, wie nachfolgend abgebildet, der Gauß'schen Normalverteilung.

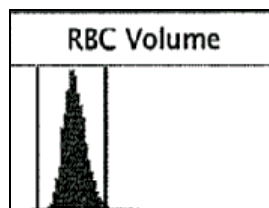


Abbildung 6: Erythrozytenverteilungskurve (RBC Volume) von Katze Nr. 184, zwischen 25 und 65 fl mit einem Maximum bei 45 fl, ADVIA™ 120

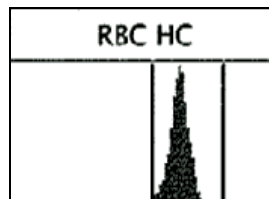


Abbildung 7: Hämoglobinverteilungskurve (RBC HC) von Katze Nr. 184, zwischen 15 und 24 mmol l⁻¹ mit einem Maximum bei 19,5 mmol l⁻¹, ADVIA™120

Aus den gemessenen Parametern Erythrozytenzahl (RBC), Mittlerem Erythrozytenvolumen (MCV) und Mittlerer Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (CHCM) kalkuliert der ADVIA™ 120 den Hämatokritwert (HCT), den Mittleren Zellulären Hämoglobingehalt (MCH), die Erythrozytenverteilungsbreite (RDW, Maß für Anisozytose), die Hämoglobinverteilungsbreite (HDW, Maß für Anisochromasie) und die Mittlere Zellhämoglobinkonzentration (MCHC). Die Resultate des roten Blutbildes werden durch interne Plausibilitätskontrollen überprüft. Hierzu wird der errechnete MCHC mit dem direkt gemessenen CHCM verglichen. Bei Abweichungen zwischen beiden Parametern über 5 % wird die Messung beflaggt und der Fehler „CHCM CC“ angezeigt. Diese Fehlermeldung warnt den Untersucher vor Einflüssen auf die zur MCHC-Messung herangezogenen Parameter (RBC, MCV, HB). Durch eine Wiederholungsmessung kann der Fehler entweder korrigiert werden, oder aber es liegen Kälteagglutinine, eine massive Hämolyse, exzessive Leukozytose oder eine Lipämie vor, die die Messung verfälschen (KOSANKE, 1999). So führt z.B. stark lipämisches Blut fälschlicherweise zu einer Erhöhung des kolorimetrisch bestimmten Hämoglobinwertes. Ist dies der Fall, ergibt sich ein nach folgender Formel berechneter erhöhter, falscher MCHC Wert:

$$\text{MCHC} = (\text{HB} / (\text{RBC} \times \text{MCV})) \times 1000$$

Diese Interferenz kann vermieden werden, indem man den MCHC durch den CHCM Wert ersetzt und zur HB Bestimmung den CHCM Wert, der direkt auf der Messung

der Einzelzelle beruht, verwendet. Dieser kalkulierte HB– Wert wird vom Gerät separat ausgewiesen.

4.3.2.1.3 Neuartige zweidimensionale Thrombozytenanalyse

Die Thrombozytenmessung erfolgt simultan mit den Erythrozyten (Kap.2.3.2.1.2) in einem Messkanal. In den H- Systemen kann nur ein Signal (Niedrigwinkelsignal) ausgewertet werden und damit nur eine Aussage über die Zellgröße getroffen werden. Hier besteht der grundlegende Unterschied zum ADVIA™ 120. Durch Verdopplung der Detektoren in den Messkanälen von 50 auf 100 ist nunmehr eine zweidimensionale Thrombozytenanalyse möglich. Zusätzlich zum Niedrigwinkelsignal (Zellgröße) kann jetzt auch das Hochwinkelsignal (Plättchendichte) zur Analyse herangezogen werden. Zur Thrombozytenanalyse wird das Niedrigwinkelsignal 30 fach, und das Hochwinkelsignal 12 fach verstärkt. Am Ursprung der Mie-Map des in Abbildung 4 dargestellten Erythrogramms (RBC Scatter) befindet sich der Thrombozytenmessbereich. Dieser Bereich ist folgend im Thrombogramm dargestellt.

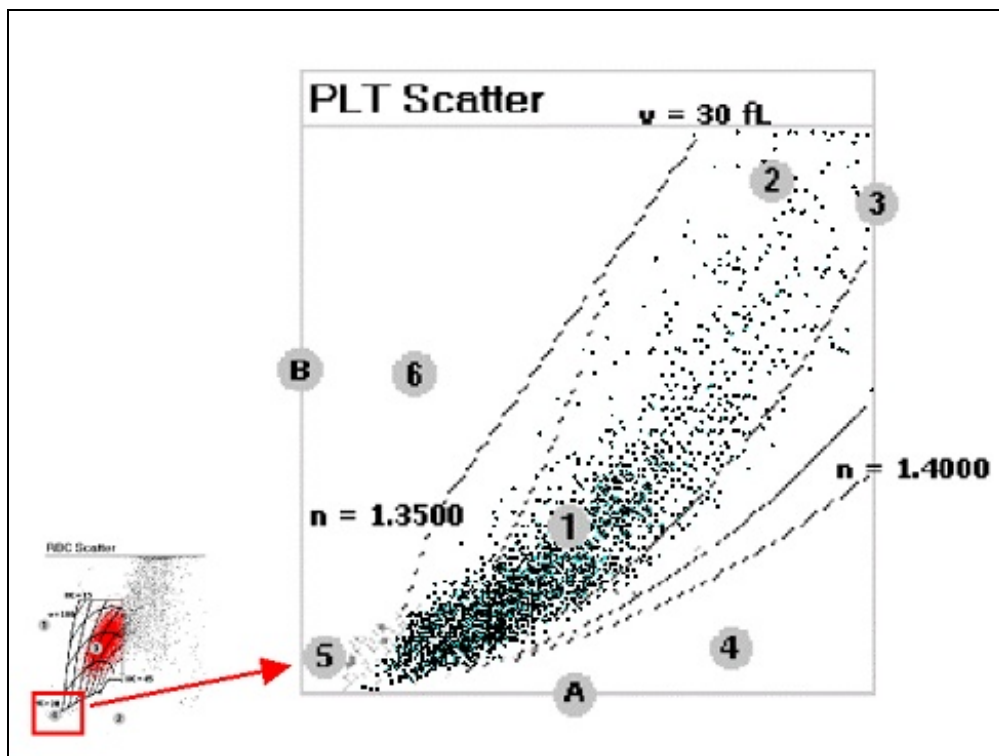


Abbildung 8: Thrombozytogramm (PLT Scatter), ADVIA™ 120

A= Hochwinkelsignal (5 - 15°)

B= Niedrigwinkelsignal (2 - 3°)

1= Thrombozyten (1 – 30 fl)

2= große Thrombozyten (30 – 60 fl)

3= Erythrozyten (Mikrozyten)

4= Fragmentozyten (Erythrozytenfragmente mit Hb, Brechungsindex > 1,40)

5= Zelltrümmer, Debris (physiologisches Rauschen)

6= RBC ghosts (Erythrozytenmembranen ohne Hb, Brechungsindex < 1,35)

n= Brechungsindex

v= Zellvolumen

(modifiziert nach ADVIA™ 120 Help Operator's Guide)

In dem abgebildeten Thrombogramm werden die Niedrigwinkelsignale auf der Y-Achse, die Hochwinkelsignale auf der X-Achse aufgetragen und mittels Mie- Theorie verrechnet. Das Niedrigwinkelsignal ist dem individuellen Zellvolumen und das Hochwinkelsignal dem Brechungsindex proportional. Dieser wiederum hängt von der Konzentration der Inneren Bestandteilen der Thrombozyten (der Plättchendichte) ab. Das Signal spiegelt sich in dem neuen Messparameter MPC wider. Das Thrombogramm enthält Zellen bis zu einem Volumen von 30 fl, Thrombozyten liegen zwischen einem Brechungsindex von 1,35 und 1,4. Interferierende Teichen wie Mikrozyten, Fragmentozyten und Erythrozytenmembranen können aufgrund des

unterschiedlichen Brechungsindex von den Thrombozyten separiert gemessen und durch Beflagung kenntlich gemacht werden (DORFMANN et al., 1997; FISCHER et al., 1997; KOSANKE, 1999). Große Plättchen sind definiert als Zellen mit einem Volumen > 20 fl und einem Brechungsindex zwischen 1,35 und 1,4. Thrombozyten mit einem Volumen zwischen 30 und 60 fl werden im Erythrogramm mitgezählt und können wiederum aufgrund des Brechungsindex als große Thrombozyten (large platelets) erkannt werden. Differenziert das Gerät mehr als 10 % der gesamten Thrombozytenzahl als große Thrombozyten, wird der Untersucher durch Beflagung darauf aufmerksam gemacht. Thrombozytenagglutinate fallen aus diesem Messbereich heraus und werden nicht mitgezählt. Sie erscheinen als separate Punktwolke im Leukogramm.

Aus der neuen Messtechnik ergeben sich nun folgende Messparameter:

- PLT (10^9 Zellen l^{-1}), Thrombozytenzahl
- MPV (fl), Mittleres Plättchenvolumen
- PCT (%), Thrombokrit
- PDW (%), Thrombozytenverteilungsbreite, (Standardabweichung der Thrombozytenverteilungskurve um das Maximum in %, Standardabweichung/MPV)
- MPC ($g\ dl^{-1}$), mean platelet component concentration, oder Mittlere Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten, entspricht der Granula der Thrombozyten, der Plättchendichte. Der MPC entspricht der mittleren korpuskulären Hämoglobinkonzentration der Erythrozyten (MCHC).
- MPM, Mean platelet mass (pg), Mittlere Thrombozytenmasse, Produkt aus MPV und MPC/ 100 und entspricht dem mittleren Hämoglobingehalt der Erythrozyten (MCH).
- PCDW ($g\ dl^{-1}$), Standardabweichung der Thrombozytenbestandteilverteilungskurve, entspricht der Hämoglobinverteilungsbreite der Erythrozyten, Standardabweichung der HB-Verteilung, Maß für Anisozytose der Thrombozyten.
- PMDW (pg), Standardabweichung der Thrombozytenmassenverteilungskurve
- Large Platelets
- Interferierende Zellen/ Zellbestandteile (Mikrozyten, Fragmentozyten, RBC-Ghosts, Debris)

Wie auch für die Erythrozyten zeigt das Gerät Thrombozytenvolumenverteilungskurven an. Diese ist im "Normalfall" logarithmisch verteilt und rechtsschief.

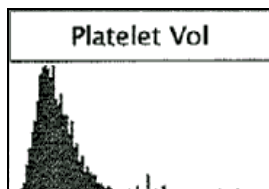
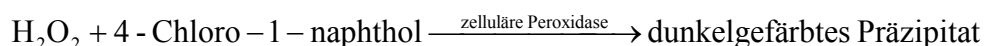


Abbildung 9: Thrombozytenvolumenverteilungskurve einer Katze, ADVIA™ 120

4.3.2.1.4 Peroxidasekanal

Die Bestimmung der Leukozytenkonzentration erfolgt in zwei voneinander unabhängigen Kanälen, dem Peroxidasekanal und dem Basophilenkanal. Im Peroxidasekanal werden die Leukozyten im Halogenlicht gezählt und anhand ihres Volumens (Streulichtsignal) und ihrer Peroxidaseaktivität (Absorptionssignal) differenziert. Nach Lyse der Erythrozyten und Fixation der Leukozyten durch das ADVIA™ 120 Perox Reagenz 1 (Surfactants = Sodium dodecyl sulfate und Brij- 35, Formaldehyd) folgt die Färbung der weißen Blutzellen durch das ADVIA™ 120 Perox Reagenz 2 (4Chloro-1-naphtol) und das ADVIA™ 120 Perox Reagenz 3 (Wasserstoffperoxid).



Die von ANSLEY und ORNSTEIN (1970) beschriebene Färbereaktion hinterlässt in Neutrophilen Granulozyten und Monozyten entsprechend dem Peroxidasegehalt dunkelbraunes Präzipitat in der Zelle. Lymphatische Zellen und Basophile Granulozyten sowie die Eosinophilen Granulozyten der Katze bleiben ungefärbt. Die so vorbereitete Leukozytensuspension wird nach hydrodynamischer Zellfokussierung (Kap.2.3.2.1.2) in der Flusszelle gemessen. Als Lichtquelle dient Halogenlicht, pro Einzelzelle wird ein Streulichtsignal (Volumen) und die Absorption (abhängig von Peroxidase-Aktivität) aufgefangen (KOSANKE, 1999). Jede Zelle wird anschließend im sogenannten Leukogramm entsprechend ihrer Größe und ihrer Peroxidaseaktivität eingetragen. Mit Hilfe der für jede Tierart spezifischen Clusteranalyse werden die so entstehenden Punktwolken eingegrenzt und einer Leukozytenpopulation zugeordnet.

Abbildung 10 zeigt ein Leukogramm einer gesunden Katze. Auf der X- Achse wird die steigende Peroxidaseaktivität und auf der Y- Achse das Volumen aufgetragen.

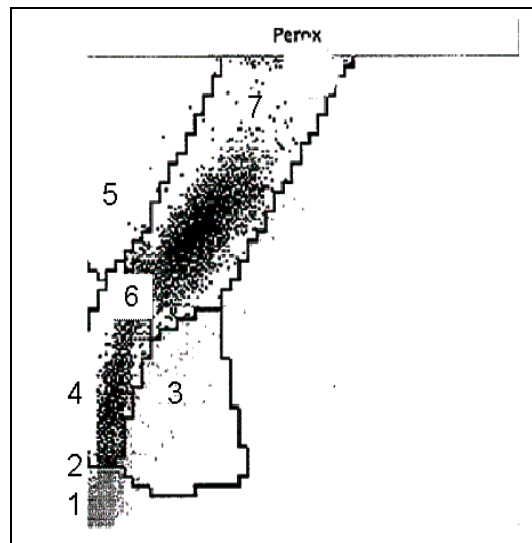


Abbildung 10: Leukogramm von Katze Nr.184, ADVIA™ 120

- 1= Rauschen (Zelltrümmer, Schmutz)
- 2= Normoblasten
- 3= Thrombozytenagglutinate
- 4= Lymphozyten und Basophile Granulozyten
- 5= LUC (Large Unstained Cells)
- 6= Monozyten,
- 7= Neutrophile und Eosinophile Granulozyten
- X-Achse= Peroxidasegehalt
- Y-Achse= Zellgröße

Durch die Clusterung lassen sich fünf Populationen unterscheiden:

- Lymphozyten (kleine peroxidasenegative Zellen, Korrektur siehe Basophilenkanal),
- Monozyten (größere peroxidasenegative Zellen),
- LUC (large unstained cells, große ungefärbte Zellen, z.B. Blasten, lymphatische Reizformen, Plasmazellen),
- Neutrophile Granulozyten (große gefärbte Zellen) und Eosinophile Granulozyten.

Die Eosinophilen Granulozyten der Katze sind peroxidasenativ und können im Peroxidasekanal nicht eindeutig von der Neutrophilenpopulation differenziert werden (Kapitel 2.4.2). Aus diesem Grund wird am Anschluss an diese Studie für die Eosinophilendifferenzierung eine neue Messmethodik untersucht. Dabei werden die Eosinophilen Granulozyten im Retikulozytenkanal erfasst und anschließend dem Differenzialblutbild zugefügt. Die genaue Beschreibung der Messtechnik und der ermittelten Ergebnisse finden sich in Kapitel 5.3.3.

Das „Rauschen“ im Leukogramm wird durch Zelltrümmer, kleine Erythrozyten und Thrombozyten verursacht. Das Vorhandensein von Thrombozytenagglutinaten zeigt eine vom Ursprung des Diagramms im Winkel von ca. 60° aufsteigende Punktwolke an. Neben der graphischen Darstellung wird der Untersucher durch Warnsignale auf Agglutinate aufmerksam gemacht, die zudem vom Gerät numerisch erfasst werden.

Die Basophilen Granulozyten werden in dem Basophilenkanal (Kap.2.3.2.1.5) bestimmt und anschließend dem Differenzialblutbild hinzugefügt. Neben der Gesamtleukozytenzahl (LeukoP) werden vom Gerät das absolute und das relative Differenzialblutbild reportiert. Bei Überschreitung eines vorgegebenen Limits im LUC-Cluster wird ein Warnsignal gegeben, das zum Nachdifferenzieren auffordert. Der errechnete Parameter MPXI (Mittlerer Peroxidaseindex), der die mittlere Peroxidaseaktivität der differenzierten Leukozyten widerspiegelt, ist für die Spezies Katze noch unterdrückt.

4.3.2.1.5 Basophilenkanal

Im Basophilenkanal werden die Leukozyten mittels Laserlichtstreuung in zwei definierten Winkelbereichen gezählt. In einem ersten Reaktionsschritt werden die Erythrozyten und Thrombozyten lysiert. Im zweiten Schritt erfolgt durch das ADVIA™ 120 Baso Reagenz (Phthalsäure und Surfactant) an allen weißen Blutzellen, die Basophilen Granulozyten ausgeschlossen, ein zytoplasmatisches Stripping (entwickelt von Cremins und Orklin, Bayer Diagnostik, 1992). Die so präparierte Leukozytensuspension, bestehend aus Zellkernen und ungestrippten Basophilen Granulozyten, gelangt nun in die Flusszelle. Dort wird nach hydrodynamischer Zellfokussierung ein Niedrigwinkelsignal (2 - 3°) und ein Hochwinkelsignal (5 - 15°) aufgefangen. Im Nukleogramm werden das Niedrigwinkelsignal (Größe) auf der Y-Achse, und das Hochwinkelsignal (Chromatindichte) auf der X-Achse aufgetragen (vgl. Abbildung 11).

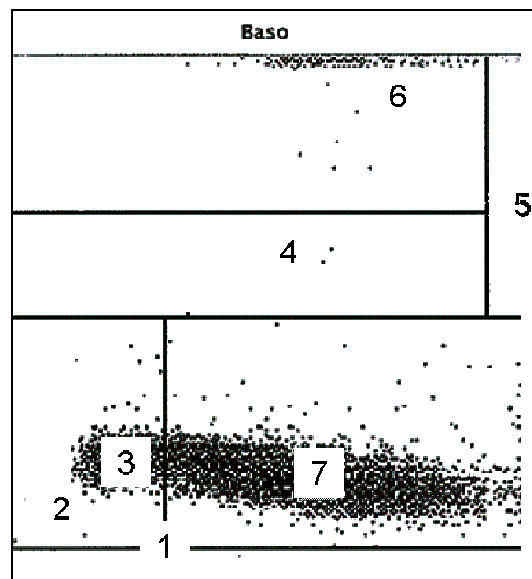


Abbildung 11: Nukleogramm von Katze Nr. 274, ADVIA™ 120

- 1= Rauschen (Zelltrümmer)
 - 2= Blasten
 - 3= Mononukleäre Leukozyten (MN) (Monozyten- und Lymphozyten)
 - 4= Basophile Granulozyten
 - 5= Pseudobasophile, lyseresistente Formen der lymphat. Reihe
 - 6= Koinzidenzen
 - 7= Polymorphnukleäre Leukozyten (PMN), Neutrophile und Eosinophile Granulozyten
- X-Achse= Zellkernchromatindichte
Y-Achse= Zellgröße

Durch die tierartspezifische Cluster-Analyse können drei Populationen (Basophile Granulozyten, mononukleäre Leukozyten, polymorphnukleäre Leukozyten) separiert werden. Die Basophilen Granulozyten werden allein aufgrund ihrer Größe von den anderen Populationen abgegrenzt und unter Korrektur der im Peroxidasekanal gemessenen Lymphozyten dem Differenzialblutbild hinzugefügt ($\text{Lymphozyten}_{\text{Diff}} = \text{Lymphozyten}_{\text{Perox}} - \text{Basophile}$). Die Population der mononukleären Leukozyten hat eine rundliche, die der polymorphnukleären Leukozyten eine langgestreckte Form, so dass im Nukleogramm eine typische Wurmform entsteht. Das Tal zwischen „Kopf“ (mononukleäre Leukozyten) und „Schwanz“ (polymorphnukleäre Leukozyten) ist bei der Katze nicht sehr deutlich ausgeprägt.

Folgende in der Humandiagnostik möglichen Warnsignale und Fehlermeldungen sind bei der im Rahmen dieser Studie eingesetzten Software für die Tierart Katze noch unterdrückt.

- Warnsignal „Left shift“, Linksverschiebung oder „Left shift, IG“, das neben einer Linksverschiebung auch unreife Granulozyten (Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten) im peripheren Blut anzeigt. Dieses Signal wird bei Verschwinden des Tals zwischen den mononukleären und polymorphnukleären Zellen im Basophilenkanal erzeugt.
- Ein weiterer Warnhinweis für eine Linksverschiebung ist der Lobularitätsindex LI, der nach folgender Formel berechnet wird:

- $$LI = \frac{PMN\text{-Zellen}}{MN\text{-Zellen}}$$

Beim Menschen liegt der Lobularitätsindex zwischen 1,9 und 3,0, beim Hund zwischen 2,1 und 2,9.

- „Blasten“ ist ein weiteres vom Gerät angezeigtes Warnsignal, das auf eine Vermehrung von Myelo- und Lymphoblasten hinweist (links unterhalb der MN-Population und oberhalb der jeweiligen Population).
- Ein weiteres in der Tiersoftware noch unterdrücktes Signal, ist der Hinweis auf Normoblasten. In der Humansoftware wird auf das Vorliegen von Normoblasten (NRBC) sowohl durch Beflagung als auch quantitativ hingewiesen.

Im Blutbild wird die im Basophilenkanal gemessene Leukozytenzahl (LeukoB) reportiert. Dies stellt nach KLINGLER (1997) eine Verbesserung der bislang aus dem Peroxidasekanal (LeukoP) angegebenen Leukozytenzahlen dar (KLINGLER, 1997). Durch Vergleich von LeukoP und LeukoB prüft das Gerät intern auf Plausibilität im weißen Blutbild. Weisen die Parameter eine bestimmte Differenz auf, wird der Fehler WBC- CE(WC) angezeigt.

4.3.2.1.6 Retikulozytenzählung

Die Möglichkeit der tierartspezifischen Retikulozytenzählung ist eine grundlegende Neuerung im Vergleich zu den H- Systemen. Die Retikulozyten werden im Laserlicht gezählt und mit Hilfe zweier Streulichtsignale und einem Absorptionssignal differenziert.

Nach isovolumetrischer Aufkuglung der roten Blutzellen durch das ADVIA™ 120 autoReti Reagenz (surfactant, cationic dye, Oxazine 750) erfolgt in einem zweiten

Schritt die Anfärbung der RNA der Retikulozyten durch das Chromogen Oxazin 750, einem Neumethylenabkömmling. Von der so vorbereiteten Zellsuspension wird nach hydrodynamischer Zellfokussierung im Laserlicht ein Niedrigwinkelsignal (Zellgröße), ein Hochwinkelsignal (Hämoglobingehalt) und die Absorption (RNA- Gehalt) von insgesamt 20.000 Zellen registriert. Die Ergebnisse dieser Messung zeigt das Retikulozytogramm graphisch. Auf der Y- Achse wird die Zellgröße (Niedrigwinkelsignal), auf der X- Achse die Absorption (RNA- Gehalt) aufgetragen. In der folgenden Abbildung ist das Retikulozytogramm einer gesunden Katze dargestellt.

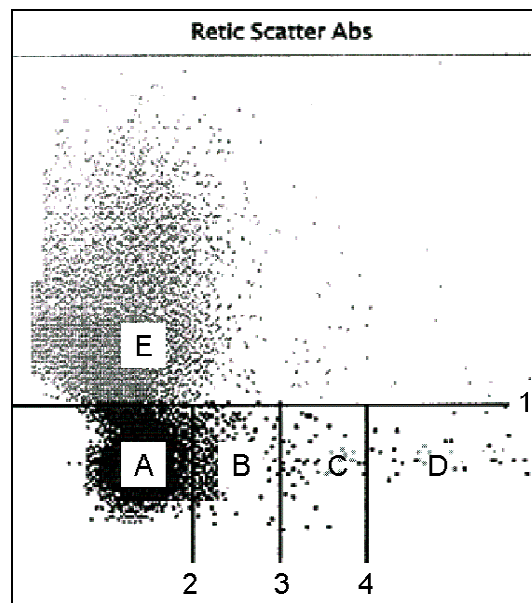


Abbildung 12: Retikulozytogramm (RETIC Scatter Abs) von Katze Nr. 184, ADVIA™ 120

A= reife RBC

B= L- Retikulozyten (Retikulozyten mit schwacher Absorption
= hohe Reifungsstufe)

C= M- Retikulozyten (Retikulozyten mit mittlerer Absorption
= mittlere Reifungsstufe)

D= H- Retikulozyten (Retikulozyten mit starker Absorption
= niedrige Reifungsstufe)

E= Koinzidenzen

1= Schwellenwert zu Koinzidenzen

2= Schwellenwert zwischen RBC und L-Retikulozyten

3= Schwellenwert zwischen L-Retikulozyten und M-Retikulozyten

4= Schwellenwert zwischen M-Retikulozyten und H-Retikulozyten

X-Achse= Absorption

Y-Achse= Zellgröße

Wie aus dem Retikulozytogramm ersichtlich ist, ermöglicht diese Technik nicht nur die Differenzierung der gefärbten Retikulozyten von den ungefärbten Erythrozyten, sondern auch eine Subklassifikation in verschiedene Reifungsstadien innerhalb der Retikulozytenpopulation.

Neben der absoluten (# Retic) und relativen (% Retic) Retikulozytenkonzentration und den Retikulozytenindizes MCVr (mittleres Retikulozytenvolumen), RDWr (Retikulozytenverteilungsbreite), HDWr (Hämoglobinverteilungsbreite der Retikulozyten) und CHCMr (mittlere Hämoglobinkonzentration der Retikulozyten) werden die absoluten (# L Retic, # M Retic, # H retic) und relativen Konzentrationen subklassifizierter Retikulozyten reportiert (MORITZ et al., 2004). Im Folgenden ist beispielhaft der Datenreport einer Katze dargestellt.

Routine Retic			
	%	#	
Retic:	0.4	38.3	x10 ⁹ cells/L
CHR:		19.1	pg
CHm:		16.9	pg

Retic		
	%	#
Neg RBC:	99.6	98312
Retic:	0.4	38.3
L Retic:	78.7	288
M Retic:	11.2	41
H Retic:	10.1	37
IRF-H:	10.1	
IRF-M+H:	21.3	
RTC Cells Acquired:		131608
RTC Cells Analyzed:		125214
RTC Gated Cells:		98678
Retic Count:		366

Abbildung 13: Datenreport (Routine Retic und Retic) von einer Katze, ADVIA™ 120

4.3.2.1.7 Qualitätskontrollen und Kalibration

Vor Beginn, nach Beendigung und bei Bedarf auch während eines Messeinsatzes erfolgt die Qualitätskontrolle mit insgesamt fünf humanen Kontrollblutproben (CBC/ Diff TEST point Low, Normal, High und Reti TEST point Low, High) der Firma Bayer. Nach den Kontrollmessungen werden die Ergebnisse mit Hilfe der übersichtlichen Darstellung auf dem Probenkontrollbildschirm mit den „Sollwerten“ verglichen und die Messung auf Richtigkeit überprüft werden. Bei Abweichungen wird nach der Fehlerquelle gesucht.

Die Kalibration des ADVIA™ 120 (Kalibratoren OPTIpoint, SETpoint, Firma Bayer) wrd gemäß Herstellerangaben im Rahmen der regelmäßigen Wartungen mit humanem Frischblut durch das Wartungspersonal der Firma Bayer durchgeführt.

4.3.2.2 Technicon H*1

Der Technicon H*1 der Firma Bayer Diagnostic München ist ein Vorgängermodell des ADVIA™ 120. Die Messtechnik des H*1 beruht auf dem optoelektronischen Messprinzip. Die Blutzellen werden mit Hilfe der Doppel-Laser-Streulichtmessung (Erythrozyten, Thrombozyten), der Halogenstreulichtmessung (Leukozytenvolumen) und der Absorptionsmessung (Leukozytendifferenzierung) analysiert. Die Messung der Retikulozyten wie beim ADVIA™ 120 ist allerdings noch nicht möglich.

Zur Untersuchung der Blutproben findet die Multi-Spezies Software 3.0 (Version 1992) mit der tierartsspezifischen Einstellung Katze Verwendung. Für jede Messung werden 145 µl antikoaguliertes Vollblut benötigt. Dem Untersucher stehen wahlweise zwei Testanforderungen zur Verfügung. Bei Anforderung des kleinen Blutbildes können 80 Proben, bei Anforderung des großen Blutbildes 60 Proben in der Stunde gemessen werden. Die Bedienung des Gerätes erfolgt mit Hilfe des Bedienungsfeldes auf der analytischen Einheit und der Tastatur der Dialogeinheit. Während die gesamte hämatologische Analytik beim ADVIA™ 120 in einem Acrylblock (UFC-Block) erfolgt, bestehen die Proben- und Reagenzkanäle beim H*1 aus wartungsanfälligeren Silikonschläuchen und Quetschventilen. Die Ergebnisdarstellung auf dem Bildschirm kann vom Benutzer selbst nicht konfiguriert werden; es stehen insgesamt neun verschiedene Ergebnisdarstellungen für Berichts-, Labor- und Forschungszwecke zur Verfügung.

Da die Messtechnik sich von der des ADVIA™ 120 weitgehend nicht unterscheidet, soll in der folgenden Beschreibung der einzelnen Messkanäle nur auf die Unterschiede eingegangen werden.

4.3.2.2.1 Erythrozyten-/ Thrombozytenkanal

Die Thrombozyten können in den H*1-Systemen aufgrund einer schlechteren Auflösung in den Messkanälen nur mit Hilfe des Niedrigwinkelsignals analysiert werden. Bei dieser eindimensionalen Analyse kann somit nur eine Aussage über die Thrombozytenzahl, das Mittlere Plättchenvolumen, den Thrombokrit und die Thrombozytenverteilungsbreite getroffen werden. Interferierende Teilchen wie Mikrozyten, Fragmentozyten und Erythrozytenmembranen können nicht sicher ausgeschlossen werden. Große Thrombozyten, die in den Erythrozytenmessbereich fallen, werden nicht erkannt. Auf Thrombozytenagglutinate wird der Untersucher nur

visuell durch eine im Winkel von ca. 60° aufsteigende Punktwolke im Leukogramm aufmerksam gemacht. Quantitative Aussagen werden nicht getroffen.

4.3.2.2.2 Peroxidasekanal

Im Blutbild wird, im Gegensatz zum ADVIA™ 120, die im Peroxidasekanal gemessene Leukozytenzahl (LeukoP) reportiert.

4.3.2.2.3 Basophilenkanal

Die Überprüfung der Plausibilität des im Peroxidasekanal gemessenen Leukozytenergebnisses erfolgt mit Hilfe der im Basophilenkanal gemessenen Leukozytenzahl (LeukoB).

4.3.3 Quantitative Buffy Coat-Analyse (QBC®)

Die Quantitative Buffy Coat® Analyse wird Ende der achtziger Jahre in die Veterinärmedizin eingeführt (BROWN und BARSANTI, 1988; FISCHER et al., 1989; HOFMANN-LEHMANN et al., 1998; MEISTER et al., 1990). Mit Hilfe dieser Messtechnik können die Parameter WBC, HCT, PLT, die relative und absolute Zahl der Granulozyten und Lymphozyten plus Monozyten bestimmt werden (EDER und FRITSCHKE, 1986). In einer Präzisionskapillare wird eine definierte Menge ungerinnbar gemachtes Blut aufgesaugt. Nach anschließender Zentrifugation wird der Buffy Coat® durch einen in die Kapillare eingesetzten Schwimmer, der etwa dem spezifischen Gewicht der BuffyCoat®-Zellen entspricht, gespreizt. Aus der Beschichtung der Kapillare dringt Acridinorange in die Zellen ein und lagert sich an die Nucleinsäuren und Glykosaminoglykane bzw. Lipoproteine an (MORITZ, 2000; WEGMANN et al., 1997). Im Ablesegerät (Autoreader, 460 nm, Gelbblockfilter) werden die fluoreszierenden Zellpopulationen anhand ihres spezifischen Fluoreszenzmusters identifiziert und mit Hilfe der Schichtdicke deren Zellzahl bestimmt. Die Intensität der Fluoreszenzsignale wird in Form einer BuffyCoat®-Profilkurve reportiert. Sie dient neben der graphischen Darstellung der Zusammensetzung auch als interne Qualitätskontrolle (WEGMANN et al., 1997).

4.4 Hämatologische Blutuntersuchung bei der Katze

4.4.1 Blutzellzählung

Im Folgenden sollen die bei der Katze auftretenden und aus der Literatur bekannten Schwierigkeiten bei der automatischen Blutzellenzählung und –differenzierung behandelt werden. Hier stehen die Thrombozyten, die Problematik der Agglutinatbildung, deren Ursache und Möglichkeiten der Vermeidung und die messtechnischen Auswirkungen bei optoelektronischen und konduktometrischen Messgeräten im Vordergrund.

Die Thrombozyten, Zytoplasmaabschnürungen von Megakaryozyten im Knochenmark, spielen eine wichtige Rolle bei der primären Hämostase. Bei einem Gefäßdefekt schaffen sie durch die Bildung eines Plättchenpfropfes nach visköser Metamorphose die Grundlage der Blutstillung. Die bei der Aggregation freiwerdenden Plättcheninhaltsstoffe unterstützen die Gerinnung. ADP führt zu einer vorerst reversiblen Plättchenaggregation, Serotonin ruft eine weitere Gefäßkonstriktion hervor und Thrombin schließlich bewirkt eine irreversible Thrombozytenaggregation (JAIN, 1993; KRAFT und DÜRR, 1999). Thrombozyten spielen auch bei entzündlichen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Neben der Ausschüttung von Entzündungsmediatoren verstärken aktivierte Thrombozyten durch Releasing-Moleküle die Aktivität von Mastzellen, Basophilen und Neutrophilen Granulozyten (MACEY et al., 1999).

Die Thrombozytenzählung bei der Katze ist in der veterinärmedizinischen Diagnostik eine große Herausforderung. Ein Grund hierfür ist das häufige Auftreten von Thrombozytenagglutinaten bei feline Blutproben (HART und NOLTE, 1991; JAIN, 1993; MISCHKE et al., 1995; MORITZ und HOFFMANN, 1997; PFEIL und GENSCHOW, 1987; TVEDTEN, 1993a; WEISER, 1983; ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998). ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998) weisen bei einer Untersuchung von 39 Blutproben bei 24 (61 %) Proben Agglutinate nach (ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998). In einer Untersuchung von MORITZ und HOFFMANN (1997) treten bei 52 % der Proben Agglomerate auf (MORITZ und HOFFMANN, 1997). Die Ursache für die Agglutinationsneigung von Katzenthrombozyten liegt in dem extrem leistungsfähigen Hämostasesystem der

Katze. Im Vergleich zum Hund sind die Thrombozyten zwei- bis dreimal so groß (JAIN, 1993; WEISER und KOCIBA, 1984). Bei einer Untersuchung von KARPAKTIN (1978) an Humanblut nimmt die Aggregationsfähigkeit der Thrombozyten mit der Größe zu (KARPATKIN, 1978). JAIN (1993) stellt fest, dass große Thrombozyten metabolisch und funktionell aktiver sind als kleine (JAIN, 1993). So lassen sich zum Beispiel die Thrombozyten der Katze durch verschiedene Aggregationsinduktoren (Kollagen, ADP, Thrombin) in wesentlich geringeren Konzentrationen stimulieren als beim Hund (HART und NOLTE, 1991). Zudem ist die Katze sehr stressanfällig. Durch die Umstände der Blutentnahme, die Fixation, das Stauen der Vene und Gefäßendothelverletzungen kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Aggregationsinduktoren (HOFMANN-LEHMANN et al., 1998; MORITZ und HOFFMANN, 1997).

Die Faktoren, die eine Thrombozytenagglutination verursachen können sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Die folgende Literaturübersicht fasst den Einfluss der Entnahmetechnik, des Entnahmeortes und Antikoagulanzen auf die Untersuchungsergebnisse zusammen.

Für das Auftreten von Thrombozytenagglutinen wird in erster Linie die Technik der Blutentnahme verantwortlich gemacht (KILLINGSWORTH et al., 1985; MORITZ und HOFFMANN, 1997; WEISER und KOCIBA, 1984). Beruhend auf der von WEISER und KOCIBA (1984) publizierten Zweispritzentechnik zeigen MORITZ und HOFFMANN (1997) im Mittel doppelt so hohe Thrombozytenzahlen wie bei denen nach herkömmlicher Methode gewonnenen Blutproben auf. Hierzu werden die ersten 5 ml des mit Hilfe einer Flügelkanüle mit Infusionsschlauch gewonnenen Blutes verworfen und der Inhalt der zweiten Spritze in ein mit EDTA-antikoaguliertes Röhrchen überführt. In der zweiten Spritze ist aufgrund des wesentlich niedrigeren Gehalts an Aggregationsinduktoren mit einer geringeren Aggregationsbereitschaft der Thrombozyten zu rechnen (MORITZ und HOFFMANN, 1997). Allerdings lässt sich eine Thrombozytenagglomeration trotz größter Sorgfalt nicht vermeiden. So weisen acht der zehn Blutproben keinen Hinweis auf Agglutinate auf, bei zwei Proben lagen geringgradig verklumpte Thrombozyten vor (MORITZ und HOFFMANN, 1997).

Der Einfluss des Entnahmeortes (V. jugularis oder V. cephalica antebrachii) und damit unterschiedlichen Bedingungen bezüglich der Gefäßgröße, des Blutvolumens und der Blutflussgeschwindigkeit beurteilen MORITZ und HOFFMANN (1997) als

vernachlässigbar. Bei 52 % der aus der V. cephalica antebrachii gewonnenen Proben treten Agglutinate auf, für Proben aus der V. jugularis kann dies bei 38 % festgestellt werden (MORITZ und HOFFMANN, 1997; SUCHFORT, 1998). KILLINGSWORTH et al. (1985) erhalten ähnliche Ergebnisse (KILLINGSWORTH et al., 1985).

Einen größeren Einfluss auf die Bildung von Thrombozytenagglutinaten hat die Wahl des Antikoagulanzen. Wie aus humanmedizinischen Untersuchungen hervorgeht wird dem Antikoagulanzen Citrat eine Thrombozyten stabilisierende Wirkung zugeschrieben, während die Antikoagulanzen Heparin und EDTA eher Auslöser einer Agglutination sein können (KELTON, 1986; LOMBARTS und DEKIEVIET, 1988; SAVAGE, 1984; THOMPSON et al., 1983). So entzieht das Antikoagulanzen EDTA als Chelatbildner der Zelle Kalzium, wodurch es zu einer Membrandestabilisierung, Schwellung der Zelle und Ausbildung von Pseudopodien kommt (BRUMMITT und BARKER, 2000; MACEY et al., 2002). Heparin zeigt in vitro Interaktionen mit Thrombozyten, die primär vom Molekulargewicht der Präparation abhängig sind (KELTON, 1986; LOMBARTS und DEKIEVIET, 1988). MORITZ und HOFFMANN (1997) demonstrieren in einem Antikoagulanzenvergleich, dass in mit Citrat antikoagulierten Katzenblutproben deutlich seltener, und wenn, dann überwiegend geringgradige Agglutinate auftreten (MORITZ und HOFFMANN, 1997; SUCHFORT, 1998). Bei den mit EDTA antikoagulierten Proben handelt es sich hauptsächlich um hochgradige, bei den mit Li-Heparin antikoagulierten Proben lediglich um geringgradige Agglutinate (SUCHFORT, 1998). Allerdings zeigt SUCHFORT (1998), dass auch Citratverbindungen die Thrombozyten nur kurzfristig stabilisieren können, daher sollte die Thrombozytenzählung innerhalb einer halben Stunde abgeschlossen sein.

Da das Auftreten von Agglutinaten nicht oder nur sehr schwer zu vermeiden ist, versuchen TVEDTEN und KORCAL (2001) durch Vortex Mixing verklumpte Thrombozyten zu desaggregieren (TVEDTEN und KORCAL, 2001). Den Anstoß liefert ihnen eine Untersuchung von GULATI et al. (1997), die durch vortexen bei 44 % der untersuchten Humanblutproben eine vollständige, und bei 49 % eine partielle Auflösung von Thrombozytenaggregationen beobachten (GULATI et al., 1997). Zur Untersuchung von TVEDTEN und KORCAL (2001) kommen 42 agglutinierte Katzenblutproben. Zwar kann bei fast allen (41 Proben) eine höhere Thrombozytenzahl nach dem vortexen festgestellt werden, allerdings zeigen nur knapp 12 % eine komplette Auflösung der Agglutinate. TVEDTEN und KORCAL

(2001) beurteilen diese Ergebnisse in Ermangelung eines Goldstandards bezüglich der wahren Thrombozytenzahl einschränkend. Die Resultate zeigen, dass das Vortexen keine zuverlässige Methode zur Auflösung von Agglutinaten darstellt. Ursache für diese Unterschiede von Humanblut und Katzenblut sehen TVEDTEN und KORCAL (2001) in der speziesspezifischen Besonderheit der Katzenthrombozyten und der entnahmebedingten Problematik bei Katzenblutproben (TVEDTEN und KORCAL, 2001).

Liegen Thrombozytenaggregationen in der zu untersuchenden Probe vor, so ist unabhängig von der Messtechnik eine akkurate Thrombozytenzählung nicht möglich (TVEDTEN und KORCAL, 2001). Folge ist die Angabe falsch niedriger Thrombozytenzahlen (Pseudothrombozytopenien) (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; MISCHKE et al., 1995; PFEIL und GENSCHOW, 1987; SUCHFORT, 1998). Bei der Erkennung solcher Pseudothrombozytopenien stoßen die Widerstandsmessgeräte an ihre Grenzen. Obwohl es von erheblichem Interesse für Diagnose und Therapie ist, hat der Untersucher keine Möglichkeit eine echte von einer Pseudothrombozytopenie zu unterscheiden. Hier sind Hämatologiesysteme gefordert, die den Untersucher auf das Vorliegen von Thrombozytenagglutinaten aufmerksam machen. So ermöglicht das optoelektronische Hämatologiesystem Technicon H*1 der Firma Bayer eine Unterscheidung von echten und Pseudothrombozytopenien mit Hilfe des Thrombozytenclusters im Leukogramm (MORITZ und HOFFMANN, 1997; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN, 1993a).

Ein weiteres Problem bei der Thrombozytenzählung mit Widerstandsmessgeräten sind die geringen Größenunterschiede der kleinen Erythrozyten (39 - 50 fl) und der großen Thrombozyten (11 - 18 fl) der Katze (JAIN, 1993; MISCHKE et al., 1995; MORITZ und HOFFMANN, 1997; PFEIL und GENSCHOW, 1987; SUCHFORT, 1998; WEISER, 1983). In einer Untersuchung von MISCHKE et al. (1995) ist es aufgrund überlappender Volumenverteilungskurven der Erythrozyten und Thrombozyten nur in etwa der Hälfte der Proben möglich, die Thrombozyten näherungsweise zu bestimmen (MISCHKE et al., 1995). Die fälschliche Miterfassung der Thrombozyten bei den Erythrozyten führt zu Pseudothrombozytopenien. Für die Erythrozytenzählung allerdings ist dies aufgrund der zahlenmäßig deutlich stärker vertretenen Zellpopulation weniger bedeutsam (MISCHKE et al., 1995). Die folgenden Abbildungen zeigen links eine Probe, deren Thrombozytenkurve sich gut von der Erythrozytenkurve abgrenzt, und rechts eine Probe mit deutlich überlappenden Volumenverteilungskurven (platelet overflow).

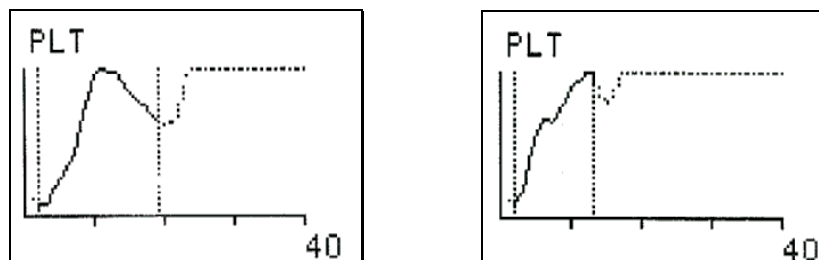


Abbildung 14: Volumenverteilungskurven (PLT) von zwei Katzen, F800
X-Achse= Partikelvolumen
Y-Achse= Partikelanzahl

Thrombozytenagglutinate beeinflussen nicht nur die Thrombozytenzählung sondern auch die Leukozytenzählung. Wie TVEDTEN (1993) beschreibt, können bei Widerstandsmessgeräten zusammengelagerte Thrombozyten die Größe von Leukozyten annehmen und irrtümlich als Leukozyten gezählt werden. Neben Pseudoleukozytosen treten auch durch in Agglomeratverbänden abgefangene Leukozyten Pseudoleukopenien auf (TVEDTEN, 1993a).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass beim Vorliegen von Thrombozytenaggregationen unabhängig von der Messtechnik eine akkurate Thrombozytenzählung nicht möglich ist (TVEDTEN und KORCAL, 2001). Sowohl bei optoelektronischen wie auch konduktometrischen Messgeräten können bei Agglutinaten falsch niedrige Thrombozytenzahlen gemessen werden (HART und NOLTE, 1991; MISCHKE et al., 1995; PFEIL und GENSCHOW, 1987; TVEDTEN, 1993a; TVEDTEN und KORCAL, 2001). Des weiteren können Thrombozytenagglutinate beim konduktometrischen Messprinzip Pseudoleukozytosen als auch Pseudoleukopenien verursachen (MISCHKE et al., 1995; MORITZ und HOFFMANN, 1997; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN, 1993a). Moderne Hämatologiesysteme wie der der ADVIATM 120 versprechen die Erkennung von Agglutinaten und zugleich durch verbesserte Messtechnik eine von interferierenden Partikeln separierte Thrombozytenzählung.

4.4.2 Blutzelldifferenzierung

Die automatisierte Blutzelldifferenzierung stellt sich bei der Katze problematisch dar. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgt bei den optoelektronischen Analysegeräten, wie in Kapitel 2.3 dargestellt, aufgrund ihrer Größe und Peroxidaseaktivität (Ausnahme Basophile Granulozyten, Kap.2.3.2.1.5). Die Eosinophilen

Granulozyten der Katze allerdings sind peroxidasenegativ (JAIN, 1993; TVEDTEN, 1993b). Im Perox- Scatter werden die Zellen entsprechend ihrer Größe und Peroxidaseaktivität angeordnet. Beispielhaft ein Ausdruck einer H*1- Messung einer Katzenblutprobe.

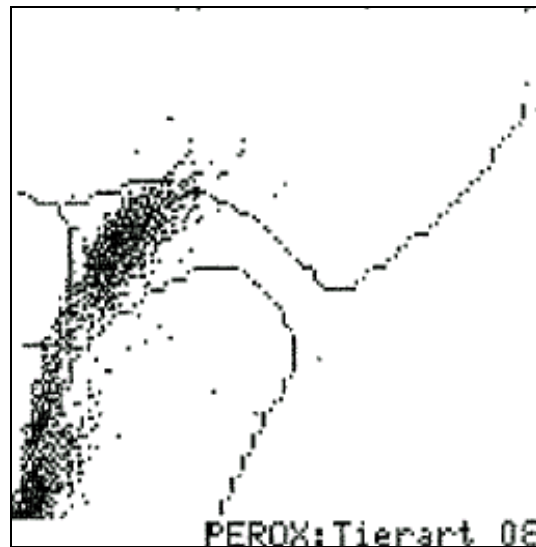


Abbildung 15: Leukogramm von Katze Nr. 18, H*1
X-Achse= Peroxidasegehalt
Y-Achse= Zellgröße

Die Eosinophilen Granulozyten fallen trotz fehlender Peroxidaseaktivität aufgrund der Eigenabsorption ihrer Granula in den Messbereich der Neutrophilen Granulozyten. Sie bilden kein eigenes Cluster (TVEDTEN und KORCAL, 1996). Aus diesem Grund können die Eosinophilen Granulozyten nur aufgrund ihrer Größe von Neutrophilen Granulozyten unterschieden werden. Da sie tendenziell etwas größer sind wie die Neutrophilen Granulozyten, finden sie sich oberhalb des Neutrophilen-Clusters (TVEDTEN und KORCAL, 1996). Diese unzureichende Differenzierungsmöglichkeit ist in der Literatur zahlreich beschrieben (JAIN, 1993; LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; MORITZ et al., 1995; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN und KORCAL, 1996). Schlechte Präzisionen (CV = 15,6 %) und niedrige Korrelationen ($r = 0,243$) für die Eosinophilen Granulozyten wie stellvertretend z.B. von SUCHFORT (1998) gefunden, lassen die Autoren übereinstimmend zu dem Schluss kommen, dass die automatische Differenzierung mit dem H*1 bezüglich der Eosinophilen Granulozyten der Katze nicht geeignet ist (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; MORITZ et al., 1995; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN und KORCAL, 1996). Wie SUCHFORT (1998) in ihren Untersuchungen zeigen kann, wird eine Eosinophilie > 10 % mit dem H*1 nur in vier, dagegen aber manuell in 37

von 246 untersuchten Katzenblutproben ermittelt. Eosinophilien $> 20\%$ werden automatisch gar nicht erkannt (SUCHFORT, 1998).

Die automatisierte Differenzierung der Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten erachten LIEDL et al. (1997) als wenig zufriedenstellend, während SUCHFORT (1998) und TVEDTEN (1996) akzeptable Korrelationen erreichen.

Die Beurteilung der Tauglichkeit der automatischen Monozytendifferenzierung wird durch zwei Dinge erschwert. Zum einen erscheinen geringgradige Variationen von Zellpopulationen geringer Häufigkeit statistisch als große Abweichungen (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997). Zum anderen ist es das Fehlen einer akkuraten und subjektiven Referenzmethode. Die manuelle Differenzierung von Monozyten ist aufgrund der im Vergleich zum Automaten wesentlich geringeren Anzahl differenzierter Zellen, des untersucherabhängigen Interpretationsfehlers und der ungleichmäßigen Verteilung der Monozyten auf dem Ausstrichpräparat nur bedingt geeignet (GOOSSENS et al., 1991b; SUCHFORT, 1998). Liedl und Hirschberger (1997) beurteilen das Ergebnis der Monozytenkorrelation des H*1 mit dem 400- Zellen - Differenzialblutbild panoptisch gefärbter Zellen ($r = 0,417$) daher als indifferent, da abschließend nicht bewertet werden kann, welche Methode dem wahren Monozytenwert näher kommt (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997). SUCHFORT (1998) gelingt eine erhebliche Verbesserung der Korrelation durch Steigerung der Anzahl differenzierter Zellen und durch den Einsatz der Spezialfärbung ANAE, die selektiv die Monozyten anfärbt (Kap. 2.2.2.3) und damit die Erkennung erleichtert (SUCHFORT, 1998).

Das Vorliegen von Stabkernigen Neutrophilen Granulozyten bei Linksverschiebungen wird von dem H*1 in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Humanblut nur unzureichend erkannt (SUCHFORT, 1998; SWAIM, 1991; TVEDTEN, 1993a; WENZ et al., 1987).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die automatische Zelldifferenzierung des H*1 für die Katze vor allem bezüglich der Eosinophilen-Differenzierung sowie der Erkennung von Linksverschiebungen nicht geeignet ist (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; MORITZ et al., 1995; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN, 1993a). Akzeptable Korrelationen liefert die Differenzierung der Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Die Beurteilung der Monozyten-

korrelationen ist im Hinblick auf die mangelhafte Referenzmethode unter Vorbehalt zu bewerten (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; SUCHFORT, 1998).

4.4.3 Retikulozyten

Die Retikulozyten verdanken ihren Namen der charakteristischen selektiven Anfärbbarkeit ihres netzartigen Retikulums durch die Supravitalfärbung (BUTTARELLO et al., 2002). Das Retikulum besteht vorwiegend aus Protein und ribosomaler RNA.

Die Retikulozytenzählung ist eine gebräuchliche Methode, die Regeneration des Knochenmarks bei Blutverlust einzuschätzen (PERKINS und GRINDEM, 1995). Die Klassifikation der Retikulozyten bei der Katze stellt sich schwierig dar. Neben dem punktierten Typ 1 (einzeln angefärbte Körnchen) findet man bei der Katze den aggregierten Typ 2 (verzweigtes Netzwerk oder klumpiges Knäuel) (KRAFT und DÜRR, 1999; TVEDTEN, 1981). Nur der aggregierte Typ 2, der im Wesentlichen den Retikulozyten anderer Tierarten entspricht, ist bei der Katze aussagekräftig und spiegelt den Grad der Knochenmarkssyntheseleistung wider (KRAFT und DÜRR, 1999; MISCHKE, 2003). Während Typ 2 nur kurze Zeit nach einem Blutverlust im Blut nachweisbar ist, zirkulieren die Typ 1 Retikulozyten bis zu zehn Tage im Blut, und erreichen parallel zur Normalisierung des Hämatokritwertes ihre Normalwerte (TVEDTEN, 1981; WEISER, 1995). Die Ursache für das kurze Auftreten der Typ 2 Retikulozyten liegt in der nur etwa 12 stündigen Reifungszeit zu den Typ 1 Retikulozyten, während die Typ 1 Retikulozyten in etwa zehn Tagen zu reifen Erythrozyten heranreifen (REAGAN et al., 1992; WEISER, 1982). Diese verlängerte Reifungszeit der Retikulozyten ist dafür verantwortlich, dass im peripheren Blut gesunder Katzen vor allem Typ 1 Retikulozyten vorhanden sind (CRAMER und LEWIS, 1972). Eine große Anzahl aggregierter Retikulozyten weist auf eine kürzliche Knochenmarksstimulation, eine große Anzahl punktierter Retikulozyten auf eine Stimulation in den letzten drei bis vier Wochen hin (PERKINS und GRINDEM, 1995).

Die manuelle Retikulozytenzählung als Standardmethode in der veterinärmedizinischen Praxis ist von mehreren Faktoren abhängig. Neben der Ausstrichqualität, spielt vor allem die subjektive Beurteilung des Untersuchers hinsichtlich der Anwesenheit und Menge des Retikulums eine Rolle (PERKINS und GRINDEM, 1995). Da es fließende Übergänge von der aggregierten zur punktierten Form gibt,

ist es schwierig, einige Zellen eindeutig zu klassifizieren (REAGAN et al., 1992). Eine weitere Schwierigkeit ist die im Vergleich zum Gesamtblut nur geringe Anzahl untersuchter Zellen. Dies spiegelt sich auch in relativ schlechten Präzisionen bei der manuellen Retikulozytenzählung wider (PERKINS und GRINDEM, 1995; REAGAN et al., 1992). DAVIES et al. (1997) ermitteln bei der manuellen Retikulozytenzählung von Humanblut einen CV von 22 % (DAVIES et al., 1997).

Die Einführung von durchflusszytometrischen Methoden, die zum einen selektiv RNA anfärben und zum anderen proportional zum RNA- Gehalt Signale erzeugen, ermöglichen die reproduzierbare Klassifikation der Retikulozyten in verschiedene Reifungsstadien (BUTTARELLO et al., 2002; VAN DE BOSSCHE et al., 2002). Durch die Untersuchung von mehreren tausend Zellen und die objektivere Beurteilung der retikulären Strukturen, ist die automatische Zählung weitaus akkurater wie die manuelle Methode (PERKINS und GRINDEM, 1995). BUTARELLO et al. (2001) sehen den Vorteil der automatisierten Retikulozytenzählung in dem hohen Probendurchsatz, der verbesserten Präzision (wesentlich bedingt durch die große Anzahl gezählter Zellen) und der Angabe des Reifungsgrades der Retikulozyten und des Retikulozytenindizes (BUTTARELLO et al., 2002). Für humane Retikulozyten können Variationskoeffizienten von 2,8 % erzielt werden (PERKINS und GRINDEM, 1995).

5 MATERIAL UND METHODEN

5.1 Tiere

Im Rahmen der Untersuchungen wird das Blut von 275 Katzen untersucht. Diese stammen zum einen aus dem Patientengut der Klinik für Kleintiere der JLU Giessen, zum anderen werden auch die institutseigenen Blutspendekatzen und private Katzen zur Blutuntersuchung herangezogen.

Die Blutentnahme erfolgt im Rahmen von Routinediagnostik und Gesundheitskontrollen.

5.1.1 Alter

Es werden Tiere im Alter von 0,5 bis 17 Jahren untersucht, das Durchschnittsalter beträgt 6,2 Jahre (arithmetischer Mittelwert).

5.1.2 Geschlecht

Das Geschlecht wird von 190 Katzen festgehalten. Davon sind 109 Tiere männlichen (davon 62 kastriert) und 81 Tiere weiblichen (davon 40 kastriert) Geschlechts.

5.1.3 Rasse

Die Patienten gehören vor allem der Rasse Europäisch Kurzhaar (85 %) an. Aber auch Karthäuser, Maine Coon, Perser, Siam und Mischlingskatzen sind vertreten.

5.2 Blutprobenentnahme

Das Blut wird mit einer sterilen Einwegkanüle (0,9 x 40 mm, Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen) aus der Vena cephalica antebrachii, der Vena femoralis oder der Vena jugularis entnommen.

5.3 Antikoagulanz

Bei den Untersuchungen werden 1,3 bzw. 10 ml fassende K₃- EDTA Röhrchen der Firma Sarstedt, Nürmbrecht verwendet. Für den Antikoagulanzenvergleich kommen neben den mit K₃- EDTA beschichteten Röhrchen noch 1,3 ml fassende Li- Heparin und Na- Citrat Röhrchen der Firma Sarstedt zum Einsatz.

5.4 Blutprobenverarbeitung

Die Probenverarbeitung ist bei den ersten 100 Katzen spätestens nach vier Stunden, bei den restlichen Tieren spätestens nach acht Stunden abgeschlossen. Die Analyse der Blutproben wird im Folgenden beschrieben.

5.4.1 ADVIA™ 120

Zur Einstellung des Gerätes wird die Spezies Katze und die Testanforderung CBC/ DIFF/ RETI (kleines Blutbild, Differenzialblutbild, Retikulozyten) gewählt. Jede mit EDTA antikoagulierte Blutprobe wird dreimal analysiert, das Ergebnis gespeichert und zusätzlich ausgedruckt. Vor Beginn, nach Beendigung und bei Bedarf auch während eines Messeinsatzes erfolgt die Qualitätskontrolle mit insgesamt fünf humanen Kontrollbluten der Firma Bayer. Die Kalibration des ADVIA™ 120 wird gemäß Herstellerangaben im Rahmen der regelmäßigen Wartungen mit humanem Frischblut durch das Wartungspersonal der Firma Bayer durchgeführt.

5.4.2 Technicon H*1

Mit dem Technicon H*1 wird jede Blutprobe zweimal analysiert, das Ergebnis gespeichert und ausgedruckt. Die Kalibration und Wartung wird durch das Wartungspersonal der Firma Bayer durchgeführt.

5.4.3 Sysmex F-800

Mit diesem Gerät wird jede Probe zweimal analysiert und das Ergebnis ausgedruckt. Falls erforderlich, werden die Diskriminatoren manuell verschoben. Das Gerät wird

entsprechend den Herstellerangaben kalibriert (Hämoglobinkonzentration, Hämatokritwert) und gewartet.

5.4.4 Hätofuge A

Zur Überprüfung des mit den automatischen Zellzählgeräten ermittelten Hämatokritwertes kommt die Hochgeschwindigkeitszentrifuge der Firma Heraeus Sepatech GmbH, Osterode zum Einsatz. Von jeder Blutprobe werden zwei Mikro-Hämatokritkapillaren zu etwa 75 % gefüllt und für fünf Minuten bei 12000 U min^{-1} (5000 g) zentrifugiert. Anschließend wird der Hämatokritwert (PCV) mittels Hämatokritschablone ermittelt und der Mittelwert der beiden Messungen gebildet. Diese Hämatokritwertbestimmung ist Referenzmethode und erfüllt die von dem Normenausschuss Medizin im Deutschen Institut für Normung e.V. erarbeiteten Anforderungen (DIN 58934-1, 1997).

5.4.5 Färbungen

Zur manuellen Überprüfung der mit den automatischen Zellzählgeräten ADVIA™ 120 und H*1 erstellten Differenzialblutbildern werden von jeder höchstens vier Stunden alten Blutprobe jeweils sechs Blutausstriche angefertigt. Diese werden nach mindestens 30 minütiger Lufttrocknung mit den folgend näher erläuterten Färbungen angefärbt. Bei 1000 facher Vergrößerung werden jeweils 200 Zellen mit dem Mikroskop differenziert. Das vom ADVIA™ 120 ausgewiesene Retikulozytenergebnis wird manuell mit Hilfe der Supravitalfärbung überprüft.

5.4.5.1 Panoptische Färbung nach Pappenheim (PAN)

Die luftgetrockneten Ausstriche werden für drei Minuten mit May-Grünwald® - Lösung (May-Grünwald®-Lösung modifiziert Nr. 1424, Fa. Merck, Darmstadt) fixiert und gefärbt. Nach einminütigem Spülen mit Aqua dest. folgt für 20 Minuten die Gegenfärbung mit Giemsa-Gebrauchslösung (1 Tropfen Giemsa® - Lösung 9204, Fa. Merck, Darmstadt auf 1 ml Aqua dest.). Anschließend werden die gefärbten Ausstriche mit Aqua dest. abgespült, luftgetrocknet und mit Aquatex® (Nr. 8562, Fa. Merck, Darmstadt) eingedeckt.

5.4.5.2 Peroxidase Färbung (POX)

Die Peroxidase-Reaktion wird mit Hilfe des von der Firma Merck, Darmstadt hergestellten Färbesets Leucognost®-Pox 16303 durchgeführt.

Nach einminütiger Fixation in dem Leucognost-Fixiergemisch® und anschließendem Spülen mit Leitungswasser werden die Blutausstriche für zehn Minuten in die nach Herstellerangabe frisch bereitete Färbelösung eingestellt. Nach erneutem Spülen mit Aqua dest. und Lufttrocknung folgt die Gegenfärbung in Mayers Häkalaunlösung für zwei Minuten. Danach werden die Ausstriche drei Minuten mit Leitungswasser abgespült, luftgetrocknet und mit dem Eindeckmittel Aquatex® (Nr.8562 Fa. Merck, Darmstadt) und Hilfe eines Deckgläschens eingedeckt. Ohne Eindeckung ist die Färbung nur drei Tage, mit Immersionsöl bedeckt nur einige Stunden stabil.

5.4.5.3 α -Naphthyl-Acetat-Esterase Färbung (ANAE)

Zum Nachweis der α - Naphthyl- Acetat- Esterase wird das Färbeset Leucognost®-Est Nr. 16301 der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Die Fixation erfolgt hier für eine Minute in Leucognost®- Fixiergemisch. Anschließend werden die Objektträger eine Minute mit Aqua. dest. abgespült und für zwei Stunden in der nach Herstelleranleitung frisch bereiteten Färbelösung im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Spülen mit Aqua. dest. für zehn Sekunden werden die Ausstriche 30 Minuten in Mayers Häkalaunlösung gegengefärbt. Nach dreiminütigem Abspülen der Objektträger mit schwach alkalischem Leitungswasser und anschließender Lufttrocknung, erfolgt die Eindeckung der Ausstriche mit Aquatex® (Nr. 8562, Fa. Merck, Darmstadt). Ohne Eindeckung ist die Färbung nur fünf Tage, mit Immersionsöl bedeckt nur einige Stunden stabil.

5.4.5.4 Retikulozytenfärbung (Supravitalfärbung)

Die Anfärbung des Retikulums erfolgt mit der Färbelösung Brilliantkresyl- Blau. Hier werden zur fertigen Farblösung 100 μ l EDTA- Blut gegeben und vermischt. Nach 20 Minuten Inkubationszeit und erneutem Mischen wird ein Ausstrich angefertigt und luftgetrocknet. Es werden insgesamt 1000 Erythrozyten differenziert und der Anteil an Retikulozyten in Prozent angegeben.

5.5 Versuchsprotokoll

Im Folgenden werden die zur Eignungsprüfung des Hämatologiesystems ADVIA™ 120 durchgeführten Untersuchungen dargestellt.

5.5.1 Präzision

Die Messpräzision des ADVIA™ 120 wird anhand von zwei im Folgenden erläuterten Messanordnungen, der Präzision innerhalb der Serie und der Präzision über verschiedene Serien hinweg, ermittelt.

5.5.1.1 Präzision innerhalb der Serie

Zur Überprüfung der Präzision innerhalb der Serie für die Parameter der Blutzellenzählung, Retikulozytenzählung und Blutzellendifferenzierung wird eine mit EDTA antikoagulierte Katzenblutprobe 25 mal hintereinander mit dem ADVIA™ 120 gemessen.

5.5.1.2 Präzision über verschiedene Serien hinweg

Die Überprüfung der Präzision über verschiedene Serien hinweg erfolgt über die 3 fache Messung (ADVIA™ 120) und 2 fache Messung (H*1, F800) von insgesamt 275 mit EDTA antikoagulierten Blutproben für die Parameter der Blutzellenzählung, Retikulozytenzählung und Blutzellendifferenzierung.

5.5.2 Linearität und Carry over beim ADVIA™ 120

Ziel dieser Untersuchung ist die Evaluierung der Linearität und Verschleppung bei der Multispezies-Software des ADVIA™ 120. Die Linearität und das Carry over werden bei der Katze für RBC und HB untersucht. Hierzu werden 40 ml EDTA- Blut in einer Kühlzentrifuge bei 4°C für 25 Minuten bei 750 g zentrifugiert. Der blutplättchenfreie Überstand wird anschließend abpipettiert und dient als 0% Pool. Aus dem Zentrifugat wird durch Mischen mit dem 0% Pool ein 100% Pool mit ungefähr $12,0 \times 10^6$ Erythrozyten μl^{-1} hergestellt. Durch weiteres Verdünnen des 100% Pools mit dem 0% Pool wurde ein 80%, 60%, 40%, 20% und 10% Pool

präpariert. Zur Überprüfung der Linearität werden die Verdünnungen hintereinander gemessen. Direkt im Anschluss folgt die Messreihe für das Carry over. Hier werden der 0% und 100% Pool sechsmal hintereinander in der Reihenfolge 100%, 0%, 0% Pool gemessen.

Da für die Ermittlung der Linearität und des Carry overs von WBC und PLT mindestens 60, besser 80 ml Blut benötigt werden, wurde im Rahmen dieser Studie für die Tierart Katze keine Bestimmung durchgeführt.

5.5.2.1 Statistik Linearität und Carry over beim ADVIA™ 120

Aufgrund der äußerst geringen Varianz der Wiederholungsmessungen aus den einzelnen Verdünnungsstufen ist der Test auf Linearität in Form des F-Testes (Varianzquotiententest) nicht durchführbar. Stattdessen wird eine Korrelationsanalyse mit Angabe des Korrelationskoeffizienten r und der Hauptkomponentengerade (Hauptkomponentengleichung $y = mx + b$) berechnet.

Die Berechnung des Carry over erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Verschleppung \%} = \bar{x} (N1-N2) / N3 * 100$$

N1: 0 % Pool 1, N2: 0 % Pool 2, N3: 100 % Pool

Bei modernen Hämatologiesystemen sollen dabei Werte von 0,25 % nicht überschritten werden (BOLLINGER et al., 1987).

5.5.3 Methodenvergleich

Für den Methodenvergleich werden, wie in Kap. 3.4 beschrieben, insgesamt 275 Blutproben verarbeitet. Anschließend werden die Messergebnisse des ADVIA™ 120 mit denen der Referenzmethoden verglichen. Für die Parameter der Blutzellzählung werden der H*1, der F800 und die Hämatokritzentrifuge herangezogen. Die Parameter der Blutzelldifferenzierung werden anhand der Ergebnisse der manuell differenzierten Blutausstriche (PAN, POX, ANAE) überprüft. Das Ergebnis der Retikulozytenzählung wird mit Hilfe der manuellen Retikulozytenzählung der supravitalgefärbten Blutausstriche verglichen.

5.5.4 Antikoagulanzenvergleich

In diesem Versuch wird der Einfluss häufig verwendeter Antikoagulanzen auf die Messergebnisse von ADVIA™ 120 und H*1 untersucht. Dazu wird bei 15 Katzen nach kurzem Anstauen die V. cephalica antebrachii punktiert, und das Blut in EDTA-, Li-Heparin und Na-Citrat-Röhrchen aufgefangen. Die ersten 20 Tropfen Blut werden verworfen. Anschließend folgt eine dreifache Messung jeder Probe am ADVIA™ 120 und eine zweifache Messung am H*1, wobei die Proben eines Patienten direkt hintereinander gemessen werden. Die Messungen sind nach maximal einer Stunde abgeschlossen.

5.5.5 Verlaufsuntersuchungen

Diese Verlaufsuntersuchung dient zur Überprüfung der Stabilität der Parameter der Blutzellzählung, -differenzierung und Retikulozytenzählung bei 4° C (Kühlschranktemperatur) und 22° C (Zimmertemperatur). Von 11 Katzen wird nach Punktion der Vena jugularis Blut in zwei EDTA-Röhrchen (jeweils 8 ml) aufgefangen und anschließend über einen Zeitraum von 72 Stunden untersucht und entsprechend gelagert. Die Messungen am ADVIA™ 120 und H*1 erfolgen nach 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48, 72 Stunden.

5.5.6 2 D-Thrombozytenanalyse bei der Katze, ADVIA™ 120

Ziel dieser Untersuchung ist die Überprüfung der durch die zweidimensionale Thrombozytenanalyse gewonnenen Parameter MPV (fl) und MPC (gdl^{-1}) in Abhängigkeit von dem Agglutinationsgrad der Blutprobe.

Hierzu wird das mit EDTA antikoagulierte Blut von 266 klinisch gesunden und kranken Katzen dreifach am ADVIA™ 120 gemessen und ein Blutaussstrich angefertigt. Die Messungen sind nach maximal vier Stunden abgeschlossen.

5.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Statistikprogrammpaket BMDP/ Dynamic, Release 7.0 (Dixon, 1993) auf der Rechneranlage der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung des AOR Dr. Failing. Graphische Darstellungen werden mit Hilfe des Programms Plotit 3.2 realisiert.

5.6.1 Varianzanalyse

Eine einfaktorielle Varianzanalyse wird zur Überprüfung der Ergebnisse der Wiederholungsmessungen innerhalb der Serie und über verschiedene Serien hinweg mit dem Programm BMDP2V durchgeführt. Da die statistische Untersuchung eine Normalverteilung voraussetzt, werden nicht negative Parameter mit rechtsschiefer Verteilung logarithmisch transformiert. Die nicht normalverteilten Parameter werden anhand eines Variationskoeffizienten größer 0,4 erkannt und durch Logarithmierung näherungsweise in eine Normalverteilung überführt. Der Variationskoeffizient CV beschreibt die Streuung in Prozent um den Mittelwert ($CV = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}$). Zur Beschreibung der Messdaten werden bei normalverteilten Parametern der arithmetische Mittelwert, die Standardabweichung SD_{in} und der Variationskoeffizient CV angegeben, bei logarithmierten Parametern der geometrische Mittelwert $\bar{x}$ und der Streufaktor SF.

Eine zweifaktorielle (Lagerungsdauer, -temperatur) Varianzanalyse wird zur Bewertung der Ergebnisse der Verlaufsuntersuchungen durchgeführt.

5.6.2 Korrelationsanalyse

Im Rahmen des Methodenvergleichs wird mit dem Programm BMDP6D die statistische Signifikanz des Zusammenhangs der Messergebnisse zweier Geräte ermittelt. Nicht normalverteilte Parameter müssen vorher logarithmisch transformiert werden. Die Korrelation wird durch den Korrelationskoeffizienten r nach Pearson, sowie der mit Hilfe der Hauptkomponentenanalyse berechneten Hauptkomponentengerade mit der Gleichung $y = mx + b$ ausgedrückt. Graphisch werden die Mess-

ergebnisse und die Hauptkomponentengerade im Korrelationsdiagramm dargestellt. Bei einem nur theoretisch denkbaren Korrelationskoeffizienten von $r = 1$ entspricht die Hauptkomponentengerade der eingezeichneten Winkelhalbierenden.

5.6.3 Matched t- Test/ Wilcoxon- Test

Mit dem t- Test für verbundene Stichproben (BMDP3D) werden paarweise zugeordnete Parameter mit normalverteilten Mittelwertunterschieden auf signifikante Unterschiede zwischen den Methoden hin überprüft. Bei Parametern mit nicht normalverteilten Differenzen werden die Mittelwertunterschiede mit Hilfe des Wilcoxon-Tests untersucht (SACHS, 1992).

5.6.4 Signifikanz

Die Angabe der Signifikanz p erfolgt nach folgender Definition:

$p \leq 0,001$	hoch signifikant, h.s.
$p \leq 0,01$	signifikant, s.
$p \leq 0,05$	schwach signifikant, s.s.
$p > 0,05$	nicht signifikant, n.s.

5.6.5 Softwareadaptation und Evaluation des ADVIA™ 120

Zur Erstellung einer tierartspezifischen Software startet die Softwareadaptation nach Voreinstellung anhand von zehn Katzenblutproben durch Dr. David Zelmanovic, Tarrytown, N.Y. am 25.5.1998 mit der alpha-site (V.1.012OC). Hier werden 141 Blutproben von gesunden Katzen untersucht. Aufgrund dieser Daten wird die Softwareversion 2 (V.1.01-MS, Freigabe 6.10.98) erstellt, die wiederum an 35 Proben eingestellt wird. Die am 6.11.1998 freigegebene dritte Softwareversion (V.1.03-MS) wird an 45 Proben von gesunden und kranken Katzen überprüft. Die am 15.12.98 freigegebene vorläufige Endversion (V.1.04-MS) der speziesspezifischen Einstellung wird abschließend anhand von 54 Proben kontrolliert. Die Evaluation mündet in der Markteinführung der Multi-Species- Software Version 1.1.07-MS (derzeit aktuelle Version 1.1.08-MS).

6 ERGEBNISSE

6.1 Präzision

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Präzisionsstudien innerhalb der Serie und über verschiedene Serien hinweg dargestellt. Mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse wird bei den normalverteilten Variablen der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$, die Standardabweichung S und der Variationskoeffizient CV (%) berechnet. Liegt keine Normalverteilung vor, werden die Daten logarithmisch transformiert. In diesen Fällen erfolgt die Angabe des geometrischen Mittelwertes, des Streufaktors und des Streufaktors in Prozent.

Zunächst werden die Ergebnisse der Präzision innerhalb der Serie besprochen.

6.1.1 Präzision innerhalb der Serie, ADVIA™ 120

Die statistische Auswertung der Parameter für die Blutzellzählung, die Retikulozytenzählung und die Blutzelldifferenzierung werden im Folgenden getrennt behandelt.

6.1.1.1 Blutzellzählung

In Tabelle 1 sind die Ergebnisse ausgewählter Parameter der Blutzellzählung aufgelistet.

Tabelle 1: Präzision des ADVIA™ 120 innerhalb der Serie in der Softwareversion 4 für die Parameter der Blutzellzählung bei der Tierart Katze, n = 1, 25 fach- Messung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			Variationskoeffizient CV (%)
WBC	10^9 l^{-1}	4,85	$\pm$	0,11	2,3
RBC	10^{12} l^{-1}	8,24	$\pm$	0,07	0,9
HB	mmol l^{-1}	7,20	$\pm$	0,07	0,9
HCT	l l^{-1}	0,37	$\pm$	0,004	1,0
MCV	fl	45,53	$\pm$	0,45	1,0
MCH	fmol	0,88	$\pm$	0,01	0,9
MCHC	mmol l^{-1}	19,20	$\pm$	0,19	1,0
CHCM	mmol l^{-1}	19,40	$\pm$	0,25	1,3
RDW	%	14,87	$\pm$	0,07	0,5
HDW	mmol l^{-1}	1,22	$\pm$	0,03	2,2
PLT	10^9 l^{-1}	198,32	$\pm$	16,68	8,4
MPV	fl	13,60	$\pm$	0,34	2,5
PDW	%	74,16	$\pm$	2,71	3,6

Wie aus der Tabelle 1 hervorgeht, zeichnen sich für die Parameter der Blutzellzählung mit Variationskoeffizienten zwischen 0,5 und 2,3 % sehr gute bis exzellente Ergebnisse ab. Mit Rücksicht auf die Speziesbesonderheit bei der Katze ist die Präzision bei der Thrombozytenzählung noch als gut zu bewerten. Neben einem Variationskoeffizienten von 8,4 % beim PLT ist die gute Präzision mit einem CV von 2,5 % beim MPV hervorzuheben.

6.1.1.2 Blutzelldifferenzierung

Die Präzisionen innerhalb der Serie für die absoluten und relativen Parameter der Blutzelldifferenzierung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 2: Präzision des ADVIA™ 120 innerhalb der Serie in der Softwareversion 4 für die Parameter der Blutzelldifferenzierung bei der Tierart Katze, n = 1, 25 fach- Messung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			Variationskoeffizient CV (%)
Neutrophile G.	%	37,49	$\pm$	4,56	12,1
Lymphozyten	%	37,22	$\pm$	0,99	2,6
Monozyten	%	5,82	$\pm$	0,45	7,7
Eosinophile G.	%	19,18	$\pm$	4,45	23,2
Basophile G.	%	0,10	$\pm$	0,04	33,8
LUC	%	0,19	$\pm$	0,08	41,5
Neutrophile G.	10^9 l^{-1}	1,82	$\pm$	0,23	12,6
Lymphozyten	10^9 l^{-1}	1,81	$\pm$	0,06	3,3
Monozyten	10^9 l^{-1}	0,28	$\pm$	0,02	7,4
Eosinophile G.	10^9 l^{-1}	0,93	$\pm$	0,22	23,2
Basophile G.	10^9 l^{-1}	0,002	$\pm$	0,004	181,7
LUC	10^9 l^{-1}	0,01	$\pm$	0,005	53,6

Die Präzisionen für die absoluten Zellzahlen und prozentualen Angaben verhalten sich kongruent. Die Präzision der Neutrophilen Granulozyten (CV = 12,1 %) ist nur mäßig, währenddessen die Präzision der Lymphozyten mit einem Variationskoeffizienten mit 2,6 % als gut zu bezeichnen ist. Die im peripheren Blut weniger stark vertretenen Zellen zeigen eine höheren Variationskoeffizienten mit Werten zwischen 23,2 und 33,8 %. Auffällig ist die jedoch verhältnismäßig gute Präzision für die Monozyten mit einem CV von 7,7 %.

6.1.1.3 Retikulozytenzählung

Für die Retikulozytenzählung haben sich folgende Präzisionen ergeben:

Tabelle 3: Präzision des ADVIA™ 120 innerhalb der Serie in der Softwareversion 4 für die Parameter der Retikulozytenzählung bei der Tierart Katze, n = 1, 25 fach- Messung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$), Variationskoeffizient (CV) in %.

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			Variationskoeffizient CV (%)
Retikulozyten	%	0,58	$\pm$	0,07	12,1
Retikulozyten	10^9 l^{-1}	48,25	$\pm$	4,53	9,4

Die Variationskoeffizienten für die relative (CV = 12,1 %) und absolute (CV = 9,4 %) Retikulozytenzahl liegen im noch akzeptablen Bereich.

Im nächsten Kapitel sind die Ergebnisse der Präzision über verschiedene Serien hinweg dargestellt.

6.1.2 Präzision über verschiedene Serien hinweg

Die Ergebnisse der Präzision über verschiedene Serien hinweg werden für den ADVIA™ 120, H*1 und F800 in der Softwareversion 1 in Form von Mittelwert, Standardabweichung und Variationskoeffizient für die nichtlogarithmierten Parameter und in Form von geometrischem Mittelwert, Streufaktor und prozentualem Streufaktor für die logarithmierten Messgrößen angegeben. Aus Gründen der besseren Übersicht werden für die Softwareversionen 3 und 4 in den Tabellen nur die Variationskoeffizienten bzw. Streufaktoren in Prozent aufgeführt. Zunächst werden die Präzisionsdaten für die Blutzellzählung beschrieben.

6.1.2.1 Blutzellzählung

Für die Blutzellzählung ergeben sich für die Präzision über verschiedene Serien hinweg beim ADVIA™ 120 folgende Werte.

Tabelle 4: Präzision des ADVIA™ 120 über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellzählung bei der Tierart Katze, Dreifachmessung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) für die Softwareversion 1; Variationskoeffizient (CV)/ Streufaktor (SF) in % für die Softwareversionen 1 (n = 141), 3 (n = 80) und 4 (n = 54), * logarithmiert

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			CV(%), SF(%) 1.Vers.	CV(%), SF(%) 3.Vers.	CV(%), SF(%) 4.Vers.
WBC*	10^9 l^{-1}	10,62	$\pm$	1,03	2,65	3,2	2,85
RBC	10^{12} l^{-1}	7,64	$\pm$	0,08	1,08	1,36	1,28
HB	mmol l^{-1}	6,69	$\pm$	0,10	1,42	1,18	1,14
HCT	l l^{-1}	0,36	$\pm$	0,01	1,48	1,41	1,36
MCV	fl	47,79	$\pm$	0,29	0,62	0,57	0,75
MCH	fmol	0,89	$\pm$	0,02	1,94	1,65	1,81
MCHC	mmol l^{-1}	18,61	$\pm$	0,38	2,05	1,74	2,00
RDW	%	16,45	$\pm$	0,09	0,55	0,52	0,55
HDW	mmol l^{-1}	1,24	$\pm$	0,02	1,44	1,29	1,33
PLT	10^9 l^{-1}	277,46	$\pm$	1,09	9,31	7,89	6,22
MPV	fl	15,30	$\pm$	0,23	1,53	2,84	2,25
PDW	%	63,21	$\pm$	1,17	1,86	2,31	3,35
PCT	l l^{-1}	0,00452	$\pm$	0,0004	10,22	8,91	7,80

Aus Tabelle 4 geht hervor, dass für die Leukozytenzählung eine gute Präzision in den verschiedenen Softwareversionen mit einem SF zwischen 2,65 und 3,2 % erreicht werden können. Im Bereich des roten Blutbildes zeichnen sich sehr gute Präzisionen ab. Mit einem CV < 0,75 % fallen hier besonders die Parameter Mittleres Erythrozytenvolumen (MCV) und Erythrozytenverteilungsbreite (RDW) auf. Die größten Varianzen bei der Thrombozytenzählung werden bei den Parametern PLT (CV 6,22 - 9,31 %) und PCT (CV 7,80 - 10,22 %) festgestellt.

Die folgende Tabelle gibt die Ergebnisse der Präzision des H*1 wieder. Aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des ADVIA™ 120, sind die Präzisionen entsprechend der beim ADVIA™ 120 in den verschiedenen Softwareversionen untersuchten Proben getrennt berechnet und aufgeführt.

Tabelle 5: Präzision des H*1 über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellzählung bei der Tierart Katze, Zweifachmessung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) für die Patienten 1-141; Variationskoeffizient (CV)/ Streufaktor (SF) in % für die Patientengruppe 1 (n = 141), 3 (n = 78) und 4 (n = 53)

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			CV(%), SF(%) 1	CV(%), SF(%) 3	CV(%), SF(%) 4
WBC*	10^9 l^{-1}	11,45	$\pm$	1,03	3,07	2,18	3,54
RBC	10^{12} l^{-1}	7,15	$\pm$	0,07	0,96	0,87	0,70
HB	mmol l^{-1}	6,52	$\pm$	0,07	1,12	1,24	0,61
HCT	l l^{-1}	0,34	$\pm$	0,003	1,01	0,98	0,72
MCV	fl	48,77	$\pm$	0,25	0,52	0,44	0,70
MCH	fmol	0,93	$\pm$	0,01	1,03	1,01	1,02
MCHC	mmol l^{-1}	19,03	$\pm$	0,23	1,18	1,24	0,93
RDW	%	17,29	$\pm$	0,21	1,21	0,75	0,77
HDW	mmol l^{-1}	1,39	$\pm$	0,03	2,12	1,40	1,31
PLT*	10^9 l^{-1}	239,85	$\pm$	1,06	6,29	10,90	11,23
MPV	fl	9,73	$\pm$	0,24	2,48	1,55	2,20

Für die Parameter des roten Blutbildes können für den H*1 sehr gute Ergebnisse bei den Wiederholungsmessungen errechnet werden. Eine mäßige Wiederholbarkeit der Messungen liegt bei dem Parameter PLT vor.

Die Ergebnisse der Präzision des F800 sind entsprechend den Ergebnissen des H*1 in folgender Tabelle aufgelistet.

Tabelle 6: Präzision des F800 über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellzählung bei der Tierart Katze, Zweifachmessung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) für die Patienten 1-136; Variationskoeffizient (CV)/ Streufaktor (SF) in % für die Patientengruppe 1 (n = 136), 3 (n = 76) und 4 (n = 53), * logarithmiert

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			CV(%), SF(%) 1	CV(%), SF(%) 3	CV(%), SF(%) 4
			$\pm$				
WBC*	10^9 l^{-1}	11,24	$\pm$	1,09	9,24	7,67	9,12
RBC	10^{12} l^{-1}	7,97	$\pm$	0,09	1,08	0,88	0,74
HB	mmol l^{-1}	6,66	$\pm$	0,06	0,96	1,32	1,48
HCT	l l^{-1}	0,42	$\pm$	0,01	1,21	1,30	0,92
MCV	fl	53,81	$\pm$	0,37	0,68	0,75	0,71
MCH	fmol	0,85	$\pm$	0,01	1,49	2,45	3,25
MCHC	mmol l^{-1}	15,84	$\pm$	0,25	1,56	2,34	2,41
RDW	%	16,84	$\pm$	0,35	2,06	1,49	1,58
PLT*	10^9 l^{-1}	192,40	$\pm$	1,58	27,61	24,14	13,84
MPV	fl	12,61	$\pm$	2,35	18,60	10,25	6,15

Bei der Überprüfung der Präzision des F800 für die Blutzellzählung fällt neben der mäßigen Präzision für die Leukozytenzählung die schlechte Wiederholbarkeit für die Thrombozytenzählung und das Mittlere Thrombozytenvolumen auf.

6.1.2.2 Retikulozytenzählung

In folgender Tabelle sind die Ergebnisse der Präzisionen über verschiedene Serien hinweg für die absolute und relative Retikulozytenzahl angegeben. Auf die Präzisionen über verschiedene Serien hinweg für die verschiedenen Reifungsstadien der Retikulozyten und der Retikulozytenindizes wird im Rahmen dieser Arbeit nicht eingegangen.

Tabelle 7: Präzision des ADVIA™ 120 über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Retikulozytenzählung bei der Tierart Katze, Dreifachmessung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) für die Softwareversion 1; Streufaktor (SF) in % für die Softwareversionen 1 (n = 141), 3 (n = 80) und 4 (n = 54), * logarithmiert

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			SF(%) 1.Vers.	SF(%) 3.Vers.	SF(%) 4.Vers.
Retikulozyten*	%	0,42	$\pm$	1,23	22,92	21,49	14,07
Retikulozyten*	10^9 l^{-1}	29,46	$\pm$	1,23	23,35	22,09	12,49

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wird durch die Softwareentwicklung eine Verbesserung der Präzision der Retikulozytenzählung erzielt. Die Streufaktoren bewegen sich von 23,35 bis 12,49 %. Die Streufaktoren für die absoluten und relativen Präzisionen in den verschiedenen Versionen stimmen nahezu überein.

6.1.2.3 Blutzelldifferenzierung

Die Resultate der Präzisionsmessungen für die Blutzelldifferenzierung des ADVIA™ 120 und H*1 sind in den folgenden Tabellen zusammengestellt. Berücksichtigung finden die Ergebnisse für die prozentualen und die absoluten Anteile der einzelnen Leukozytenpopulationen. Bei der Bewertung des Differenzialblutbildes ist zu beachten, dass bei den zahlenmäßig geringer vertretenen Zellpopulationen mit höheren Variationskoeffizienten zu rechnen ist.

Tabelle 8: Präzision des ADVIA™ 120 über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzellendifferenzierung bei der Tierart Katze, Dreifachmessung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) für die Softwareversion 1; Variationskoeffizient (CV)/ Streufaktor (SF) in % für die Softwareversionen 1 (n = 141), 3 (n = 80) und 4 (n = 54), * logarithmiert

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			CV(%), SF(%) 1.Vers.	CV(%), SF(%) 3.Vers.	CV(%), SF(%) 4.Vers.
			$\pm$				
Neutrophile G.	%	55,51	$\pm$	5,47	9,86	3,14	7,03
Lymphozyten*	%	22,91	$\pm$	1,13	13,49	9,89	12,80
Monozyten*	%	2,89	$\pm$	1,31	30,82	22,88	25,43
Eosinophile G.*	%	5,90	$\pm$	2,74	74,21	59,61	79,08
Basophile G.	%	1,18	$\pm$	1,25	25,59	35,55	31,16
LUC*	%	0,50	$\pm$	1,40	39,61	36,58	29,23
Neutrophile G.*	10^9 l^{-1}	5,34	$\pm$	1,15	15,50	5,30	13,90
Lymphozyten*	10 l^{-1}	2,45	$\pm$	1,14	14,09	10,15	12,89
Monozyten*	10^9 l^{-1}	0,31	$\pm$	1,30	29,93	23,90	26,39
Eosinophile G.*	10^9 l^{-1}	0,62	$\pm$	2,88	87,67	64,69	57,83
Basophile G.*	10^9 l^{-1}	0,39	$\pm$	1,24	23,63	34,95	33,30
LUC*	10^9 l^{-1}	0,05	$\pm$	1,40	39,67	37,04	28,91

Die Wiederholbarkeit der Messergebnisse für die Präzision über verschiedene Serien hinweg ist für die Neutrophilen Granulozyten mit einem CV zwischen 3,14 und 9,86 % als akzeptabel bis mäßig zu bezeichnen. Die Lymphozyten mit einem CV zwischen 9,89 und 13,49 % zeigen eine mittlere Stabilität. Eine schlechte Präzision wird für die Basophilen Granulozyten (CV 25,59 - 31,16 %) und die Population der LUC (CV 29,23 - 39,61 %) festgestellt. Die größte Varianz wird für die Eosinophilen Granulozyten mit einem CV zwischen 59,61 - 79,08 % beobachtet. Die Variationskoeffizienten der absoluten Werte des Differenzialblutbildes entsprechen in weiten Teilen den Präzisionsmessungen der prozentualen Werte.

In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Blutzelldifferenzierung des H*1 dargestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen des ADVIA™ 120 werden die Präzisionen für die in den verschiedenen Softwareversionen untersuchten Proben getrennt berechnet und aufgeführt.

Tabelle 9: Präzision des H*1 über verschiedene Serien hinweg für die Parameter der Blutzelldifferenzierung bei der Tierart Katze, Zweifachmessung, Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$) für die Softwareversion 1; Variationskoeffizient (CV)/ Streufaktor (SF) in % für die Patientengruppe 1 (n = 141), 3 (n = 78) und 4 (n = 53), * logarithmiert

Parameter	Einheit	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			CV(%), SF(%) 1	CV(%), SF(%) 3	CV(%), SF(%) 4
Neutrophile G.	%	64,88	$\pm$	3,08	4,74	6,47	2,28
Lymphozyten*	%	17,40	$\pm$	1,17	16,56	15,18	5,50
Monozyten*	%	4,31	$\pm$	1,51	50,97	25,34	23,50
Eosinophile G.*	%	5,08	$\pm$	1,28	27,79	53,05	12,30
Basophile G.*	%	0,11	$\pm$	1,41	40,70	34,57	35,11
LUC*	%	0,06	$\pm$	1,53	52,87	55,85	6,97
Neutrophile G.*	10^9 l^{-1}	6,95	$\pm$	1,12	12,08	6,42	5,31
Lymphozyten*	10 l^{-1}	1,89	$\pm$	1,17	16,62	15,50	7,17
Monozyten	10^9 l^{-1}	0,45	$\pm$	1,31	31,39	40,00	24,98
Eosinophile G.	10^9 l^{-1}	0,58	$\pm$	1,31	30,63	46,92	12,35
Basophile G.*	10^9 l^{-1}	0,01	$\pm$	1,37	36,91	36,02	37,57
LUC*	10^9 l^{-1}	0,01	$\pm$	1,57	56,99	71,71	4,38

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, liegt eine akzeptable Stabilität für die Ergebnisse der Neutrophilen-Messung mit einem CV < 6,47 % vor. Bei den Lymphozyten bewegen sich die Variationskoeffizienten zwischen 5,5 und 16,56 %. Schlechte Präzisionen können für die Wiederholungsmessungen von LUC, Eosinophilen und Basophilen Granulozyten errechnet werden, wobei die Gruppe der LUC mit einem CV von bis zu 55,85 % die größte Varianz aufweist.

6.2 Linearität und Carry over beim ADVIA™ 120

In den beiden nächsten Kapiteln werden die Ergebnisse der Linearitätsmessung und des Carry overs dargestellt.

6.2.1 Linearität

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse der Korrelationsanalyse unter Angabe des Korrelationskoeffizienten r und der Hauptkomponentengeraden $y = mx + b$. Aufgrund der äußerst geringen Varianz der Wiederholungsmessungen aus den einzelnen Verdünnungsstufen war die Durchführung des F- Testes (siehe auch Kap. 3.5.2.1) nicht durchführbar.

Tabelle 10: Ergebnisse der Linearitätsbestimmung des ADVIA™ 120 in der Softwareversion 4 für die Parameter RBC, HB bei der Tierart Katze; r = Korrelationskoeffizient, Hauptkomponentengleichung $y = mx + b$ Signifikanz für alle Parameter $p \leq 0,001$.

Parameter	Einheit	Korrelationskoeffizient r	Hauptkomponentengleichung $y = mx + b$
RBC	10^{12} l^{-1}	1,00	$0,11x+0,05$
HB	mmol l^{-1}	1,00	$0,10x-0,13$

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, werden für die Parameter RBC und HB Korrelationskoeffizienten von $r = 1,00$ erreicht. Dieser mit $p < 0,001$ hochsignifikante Zusammenhang zwischen den gemessenen Werten und den Verdünnungsreihen wird für den Parameter RBC in einem Bereich von $0,0 - 12,33 \times 10^{12} \text{ l}^{-1}$ und für den Parameter HB in einem Bereich von $0,0 - 9,9 \text{ mmol l}^{-1}$ festgestellt.

6.2.2 Carry over

Die Ergebnisse des nach den Richtlinien VON RÜCKER et al. (1994) und BROUGHTON et al. (1974) errechneten Carry overs (gepaarter T- Test) werden in folgender Tabelle gezeigt (BROUGHTON et al., 1974; VON RÜCKER et al., 1994).

Tabelle 11: Ergebnisse der Verschleppung (%) des ADVIA™ 120 in der Softwareversion 4 für die Parameter RBC und HB bei der Tierart Katze

Parameter	Einheit	Verschleppung %
RBC	10^{12} l^{-1}	0,04
HB	mmol l^{-1}	0,00

Wie aus der Tabelle hervorgeht, weist der ADVIA™ 120 für den Parameter HB keine messbare Verschleppung auf. Das Carry over für den Parameter RBC liegt mit einem Wert von 0,04 % deutlich unter dem geforderten Grenzbereich von 0,25 %.

6.3 Methodenvergleich

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der Überprüfung der Richtigkeit (accuracy) des ADVIA™ 120 dargestellt. Diese werden mit Hilfe der Korrelationsanalyse unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Signifikanz (p), der Hauptkomponentenanalyse und des Wilcoxon- bzw. Matched- t -Tests für verbundene Stichproben durchgeführt. Für ausgewählte Beispiele werden die Ergebnisse der Korrelationsanalyse in Form einer Punktwolke im Korrelationsdiagramm dargestellt, wobei die Messwerte der verglichenen Methoden gegeneinander auf den beiden Koordinaten aufgetragen werden. Die in den Abbildungen eingezeichnete Hauptkomponentengerade mit der Hauptkomponentengleichung $y = mx + b$ (logarithmierte Werte $\lg(y) = m \lg(x) + b$) verdeutlicht den Zusammenhang der Messwerte. Bei einem Korrelationskoeffizienten $r = 1$, d.h. exakter Übereinstimmung zweier Messmethoden, entspricht die Hauptkomponentengleichung der in Form einer gestrichelten Linie eingezeichneten Winkelhalbierenden, $y = x$. Für die Korrelationsanalyse wird jeweils nur die erste Messung pro Blutprobe herangezogen.

6.3.1 Blutzellzählung

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Parameter der Blutzellzählung dargestellt. Zunächst werden die Korrelationen des ADVIA™ 120 und H*1 vorgestellt.

Tabelle 12: Korrelation des ADVIA™ 120 mit dem H*1 für die Parameter der Blutzellzählung für die Softwareversionen 1,3 und 4; r= Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; 1 (n = 141), 3 (n = 78), 4 (n = 53), logarithmiert

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
WBC*	10⁹ l⁻¹	r	0,990	0,980	0,995
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
RBC	10¹² l⁻¹	r	0,996	0,993	0,997
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
HB	mmol l⁻¹	r	0,995	0,984	0,994
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
HCT	l l⁻¹	r	0,988	0,979	0,992
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
MCV	fl	r	0,974	0,954	0,975
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
MCH	fmol	r	0,939	0,914	0,978
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
MCHC	mmol l⁻¹	r	0,577	0,610	0,758
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
RDW	%	r	0,943	0,970	0,995
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
HDW	mmol l⁻¹	r	0,868	0,740	0,962
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
PLT*	10⁹ l⁻¹	r	0,915	0,748	0,871
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
MPV	fl	r	0,034	0,135	0,106
		p	p>0,05	p>0,05	p>0,05
PCT*	l l⁻¹	r	0,714	0,800	0,829
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
PDW	%	r	0,055	0,186	0,210
		p	p>0,05	p>0,05	p>0,05

Wie aus der Tabelle 12 ersichtlich ist, werden in der Version 4 für die Parameter WBC, RBC, HB, HCT, MCV, MCH und RDW hochsignifikante Zusammenhänge mit einem Korrelationskoeffizienten $r > 0,974$ festgestellt.

Im folgenden Korrelationsdiagramm ist der hochsignifikante Zusammenhang zwischen den Geräten ADVIA™ 120 und H*1 für die Leukozytenzählung dargestellt.

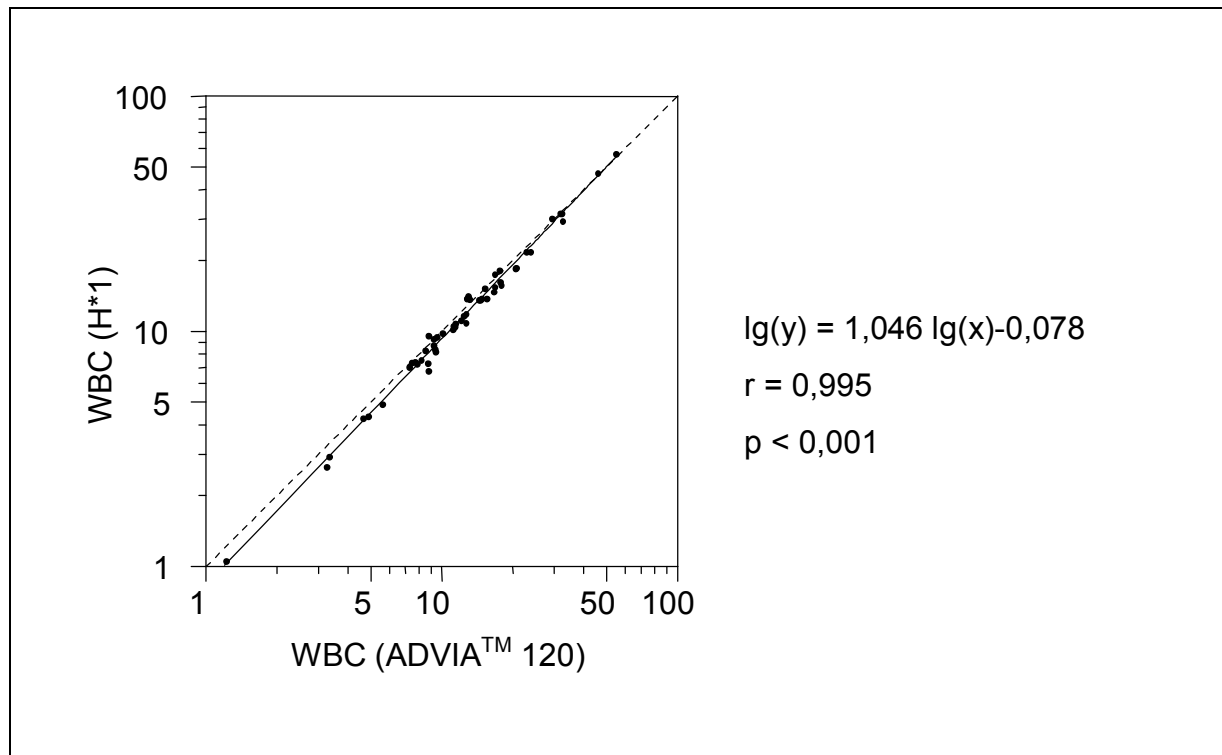


Abbildung 17: Korrelationsdiagramm für den Vergleich ADVIA™ 120/ H*1 für die Leukozytenzählung WBC (10^9 l^{-1}); Softwareversion 4, n = 53; fettgedruckte Linie: H*1, gestrichelte Linie : ADVIA™ 120

Wie aus Abbildung 17 ersichtlich ist, liegen die Messergebnisse beinahe alle auf der mit der Winkelhalbierenden fast kongruenten Hauptkomponentengeraden.

Gute bis nur mäßige Korrelationen finden sich für die Parameter HDW, PLT ($r > 0,74$) und den MCHC mit einem Korrelationskoeffizienten von $r > 0,577$. Für die Parameter MPV und PDW ergibt sich eine sehr schlechte Übereinstimmung.

Die folgende Abbildung zeigt die schlechte Übereinstimmung der Messergebnisse für das Mittlere Plättchenvolumen MPV.

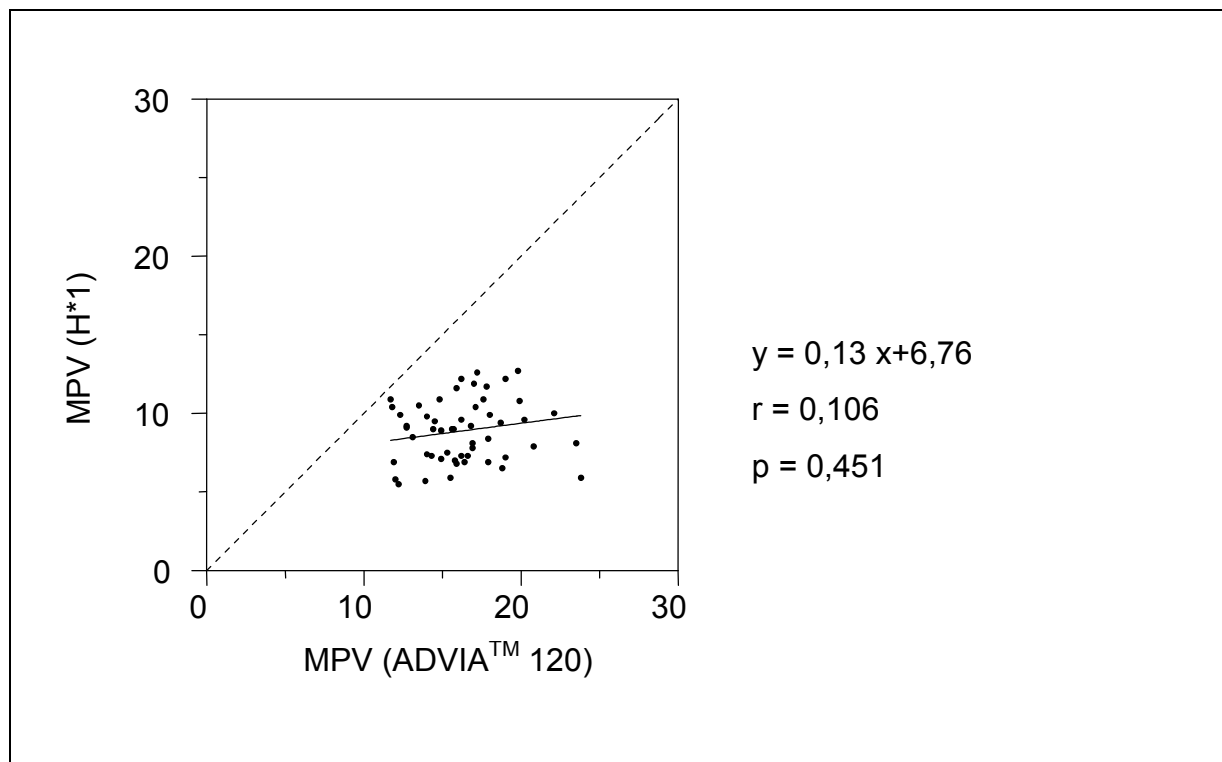


Abbildung 18: Korrelationsdiagramm für den Vergleich ADVIA™ 120/ H*1 für das Mittlere Plättchenvolumen MPV (fl); Softwareversion 4, n = 53; fettgedruckte Linie: HKG, gestrichelte Linie: WH

Aus Abbildung 18 ist der schlechte Zusammenhang anhand der Lage der Hauptkomponentengeraden im Vergleich zur Winkelhalbierenden ersichtlich. Im Durchschnitt weist der ADVIA™ 120 höhere Ergebnisse als der H*1 auf.

Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des Vergleichs ADVIA™ 120 mit dem F800.

Tabelle 13: Korrelation des ADVIA™120 mit dem F800 für die Parameter der Blutzellzählung für die Softwareversionen 1,3 und 4;
 r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; $n^1 = 136$, $n^3 = 78$, $n^4 = 53$,
 * logarithmiert

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
WBC*	10^9 l^{-1}	r	0,926	0,952	0,931
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
RBC	10^{12} l^{-1}	r	0,941	0,971	0,989
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
HB	mmol l^{-1}	r	0,986	0,986	0,991
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
HCT	l l^{-1}	r	0,921	0,940	0,963
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MCV	fl	r	0,893	0,901	0,940
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MCH	fmol	r	0,751	0,839	0,941
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MCHC	mmol l^{-1}	r	0,241	0,538	0,582
		p	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
RDW	%	r	0,622	0,814	0,498
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
PLT*	10^9 l^{-1}	r	0,316	0,775	0,907
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
MPV	fl	r	0,323	-0,198	-0,235
		p	$p < 0,001$	$p > 0,05$	$p > 0,05$

Wie der Tabelle 13 entnommen werden kann, liegen auch hier sehr gute Übereinstimmungen der Geräte für die Parameter WBC, RBC, HB, HCT vor ($r > 0,931$). Eine gute Übereinstimmung lässt sich für die Parameter MCV und MCH feststellen. Im Falle dieser beiden Parameter liegt eine stete Verbesserung über die

verschiedenen Softwareversionen auf einen Korrelationskoeffizienten mit $r > 0,94$ vor.

Eine deutliche Verbesserung der Korrelation findet sich für die Thrombozytenzählung. Hier zeigt sich nach einer erst schlechten Übereinstimmung ($r = 0,316$) in der Softwareversion 1 eine gute Korrelation mit $r = 0,907$ in Softwareversion 4. Gar keine Übereinstimmung zwischen den Geräten liegt für das Mittlere Plättchenvolumen MPV vor.

In Tabelle 14 werden die mittels ADVIA™ 120 und Mikrohämatokritzentrifuge ermittelten Hämatokritwerte verglichen.

Tabelle 14: Korrelation des ADVIA™ 120 mit der Mikrohämatokritzentrifuge für den Parameter HCT für die Softwareversionen 1, 3 und 4;
 r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; $n^1 = 141$, $n^3 = 78$, $n^4 = 53$

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
HCT	l l ⁻¹	r	0,979	0,981	0,990
		p	$p < 0,001$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

Die Tabelle verdeutlicht einen exzellenten sich noch während der Adaptation verbessernden Zusammenhang zwischen den beiden Analysemethoden ($r = 0,990$, Version 4).

In den folgenden Abbildungen sind die Korrelationsdiagramme für die Hämatokritwertbestimmung in der Softwareversion 1, 3 und 4 dargestellt. Sie zeigen während der Softwareanpassung eine Verbesserung der Korrelation von ADVIA™ 120 und Zentrifuge.

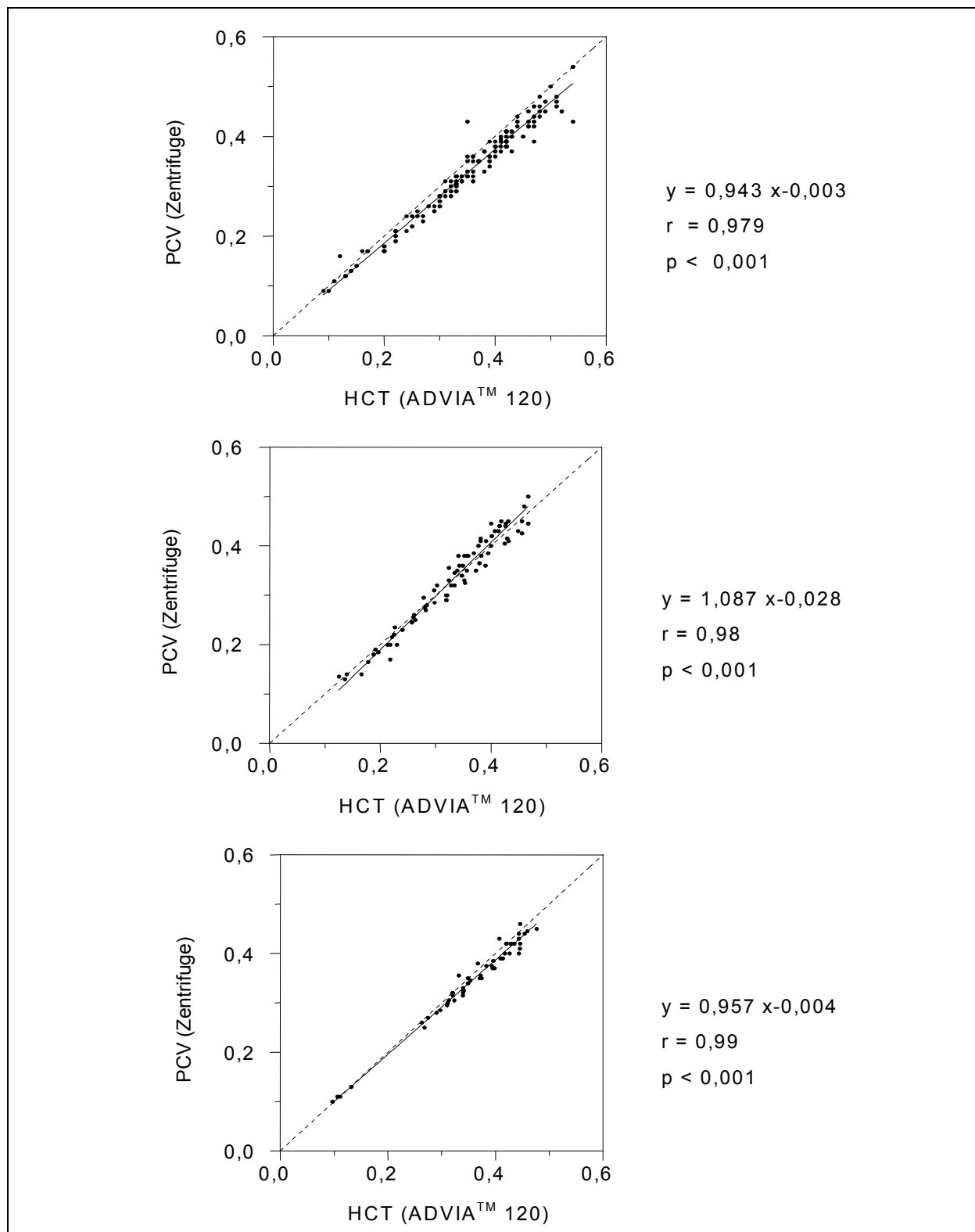


Abbildung 19: Korrelationsdiagramm für den Vergleich ADVIA™ 120/ Zentrifuge für den Hämatokritwert HCT/ PCV (l l⁻¹); Softwareversion 1 (n = 171), 3 (n° = 78) und 4 (n = 53); fettgedruckte Linie: HKG, gestrichelte Linie : WH

6.3.2 Blutzelldifferenzierung

Zur Überprüfung der Richtigkeit der Blutzelldifferenzierung wird das automatisch erstellte Differenzialblutbild des ADVIA™ 120 mit dem Differenzialblutbild des H*1 und den manuellen Differenzierungsergebnissen der panoptischen Färbung und den beiden zytochemischen Spezialfärbungen (POX, ANAE) korreliert. Die Ergebnisse werden in den folgenden Tabellen, getrennt nach den jeweiligen Referenzmethoden, dargestellt.

Tabelle 15: Korrelation des ADVIA™ 120 mit dem H*1 für die Parameter der Blutzelldifferenzierung für die Softwareversionen 1,3 und 4;
r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; $n^1=141$, $n^3= 78$, $n^4= 53$,
* logarithmiert

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
Neutrophile G.	%	r	0,538	0,596	0,902
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Lymphozyten*	%	r	0,874	0,919	0,936
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Monozyten*	%	r	0,341	0,658	0,520
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Eosinophile G.*	%	r	0,029	0,129	0,244
		p	p>0,05	p>0,05	p>0,05
Basophile G.*	%	r	0,172	0,348	0,695
		p	p>0,05	p<0,01	p<0,001
LUC*	%	r	0,271	0,184	0,121
		p	p<0,05	p>0,05	p>0,05

Wie aus Tabelle 15 entnommen werden kann, erfährt die Korrelation der Neutrophilen Granulozyten während der Softwareadaptation eine deutliche Steigerung in sehr gute Bereiche (von $r = 0,538$ auf $r = 0,902$). Auch die Übereinstimmung der Resultate für die Lymphozytenzählung ($r = 0,936$) ist als sehr gut zu bezeichnen. Nur eine mäßige Korrelation liegt für die Monozyten mit einem

Korrelationskoeffizienten r zwischen 0,341 und 0,658 vor. Auffällig ist die fehlende Übereinstimmung der Ergebnisse ($r = 0,244$, Version 4) bei der Eosinophilen-differenzierung.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Verbesserung der Korrelation der Messung von Neutrophilen Granulozyten durch die Geräte ADVIATM 120 und H*1 in der 1. und 4. Softwareversion. Die nahezu parallel zur Winkelhalbierenden verlaufende Hauptkomponentengerade in Abbildung 20 zeigt die stetig niedrigere Messung des ADVIATM 120 in Softwareversion 1.

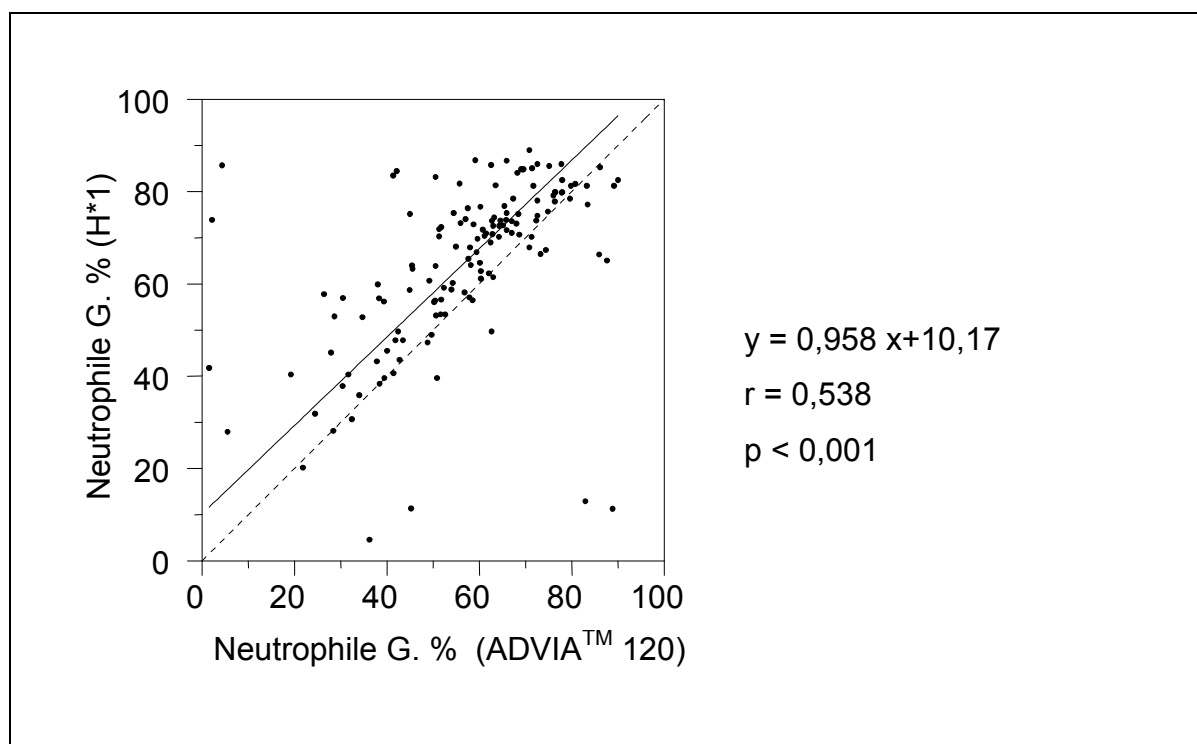


Abbildung 20: Korrelationsdiagramm für den Vergleich Neutrophile Granulozyten ADVIATM 120/ H*1; Softwareversion 1, $n = 141$; fettgedruckte Linie: HKG, gestrichelte Linie : WH

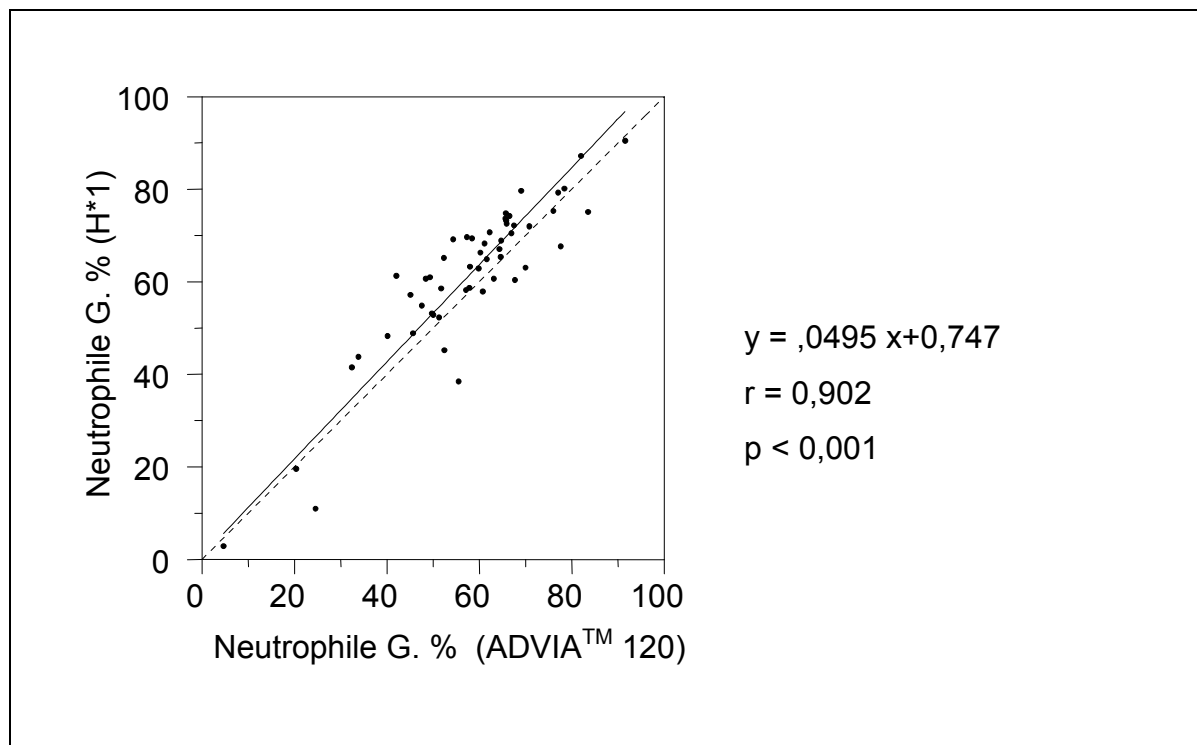


Abbildung 21: Korrelationsdiagramm für den Vergleich Neutrophile Granulozyten ADVIA™ 120/ H*1; Softwareversion 4, n = 54; fettgedruckte Linie: HKG, gestrichelte Linie : WH

Die folgenden drei Tabellen zeigen die Vergleichsergebnisse der automatischen Differenzierung (ADVIA™ 120) mit den manuell angefertigten Differenzialblutbildern der PAN-, POX- und ANAE- gefärbten Blutaussstrichen.

Tabelle 16: Korrelation des ADVIA™ 120 mit der Panoptischen Färbung für die Parameter der Blutzellendifferenzierung für die Softwareversionen 1, 3 und 4; r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; $n^1=141$, $n^3=78$, $n^4=53$, * logarithmiert

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
Neutrophile G.	%	r	0,558	0,823	0,839
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Lymphozyten*	%	r	0,774	0,880	0,824
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Monozyten*	%	r	0,318	0,473	0,419
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,05
Eosinophile G.*	%	r	-0,085	0,590	0,622
		p	p>0,05	p<0,001	p<0,001

Tabelle 17: Korrelation des ADVIA™ 120 mit der zytochemischen Peroxidase-Färbung für die Parameter der Blutzellendifferenzierung für die Softwareversionen 1, 3 und 4; r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; $n^1=141$, $n^3=78$, $n^4=53$, * logarithmiert

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
Neutrophile G.	%	r	0,447	0,837	0,830
		p	p<0,01	p<0,001	p<0,001
Lymphozyten*	%	r	0,728	0,877	0,808
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Monozyten*	%	r	0,394	0,366	0,408
		p	p<0,01	p<0,001	p<0,05
Eosinophile G.*	%	r	-0,109	0,565	0,536
		p	p>0,05	p<0,001	p<0,001

Tabelle 18: Korrelation des ADVIA™ 120 mit der zytochemischen α -Naphthyl-Acetat-Esterase-Färbung für die Parameter der Blutzelldifferenzierung für die Softwareversionen 1, 3 und 4; r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; $n^1=141$, $n^3= 78$, $n^4= 53$, * logarithmiert

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
Neutrophile G.	%	r	0,576	0,814	0,844
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Lymphozyten*	%	r	0,790	0,891	0,868
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001
Monozyten*	%	r	0,325	0,456	0,394
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,05
Eosinophile G.*	%	r	-0,049	0,463	0,664
		p	p>0,05	p<0,001	p<0,001

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich bei den verschiedenen Färbemethoden vergleichbare Ergebnisse zeigen. Ähnlich wie bei den Korrelationsergebnissen ADVIA™ 120/ H*1, kann hier für die Neutrophilen Granulozyten bei allen Färbungen eine deutliche Besserung des Korrelationskoeffizienten im Verlauf der Softwareanpassung erreicht werden. Allerdings liegen die Korrelationskoeffizienten mit $r > 0,830$ in Softwareversion 4 etwas niedriger. Gute Korrelationen zeigen die Resultate der Lymphozytendifferenzierung. Mit Korrelationskoeffizienten $r > 0,808$ ist die Übereinstimmung aber etwas schlechter, als im Vergleich mit dem H*1. Auch bei den Monozyten fallen die mäßigen Korrelationen noch etwas schlechter aus (von $r = 0,318$ bis $0,473$). Eine deutliche Verbesserung der Korrelationen von gar keiner Übereinstimmung bis zu mäßigen Ergebnissen in Softwareversion 4 ($r > 0,662$) weisen die Eosinophilen Granulozyten auf. Auf die Berechnung der Korrelation der automatisch und manuell gezählten Basophilen Granulozyten wird verzichtet, da in den manuellen Zelldifferenzierungen nur ganz vereinzelt Zellen zu finden sind.

6.3.3 Retikulozytenzählung

Die Ergebnisse der Korrelationsanalyse für die automatische und manuelle Retikulozytenzählung sind der folgenden Tabelle zu entnehmen.

Tabelle 19: Korrelation des ADVIA™ 120 mit der Supravitalfärbung für den Parameter prozentuale Retikulozytenzahl für die Softwareversionen 1, 3 und 4; r = Korrelationskoeffizient, p = Signifikanz; $n^1=139$, $n^3= 77$, $n^4= 37$, * logarithmiert

Parameter	Einheit		Version 1	Version 3	Version 4
Reti*	%	r	0,723	0,821	0,697
		p	p<0,001	p<0,001	p<0,001

Wie Tabelle 19 zeigt, kann eine akzeptable Korrelation zwischen der manuellen und automatisierten Messmethodik festgestellt werden ($r = 0,697$, Version 4).

6.4 Antikoagulanzenvergleich

Der Einfluss der drei gebräuchlichsten Gerinnungshemmer K_3 - EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat wird auf die ADVIA™ 120 und H*1 Messergebnisse der Blutzellzählung und – differenzierung anhand von 10 Katzenblutproben überprüft. Aufgrund des Verdünnungseffektes von 1: 10 bei den mit Na- Citrat versetzten Proben werden die Messergebnisse der Parameter RBC, HB, HCT, PLT, RETI und WBC mit dem Faktor 1,1 multipliziert. Zur Ermittlung einer Signifikanz werden die Ergebnisse der Drei- bzw. Zweifachmessungen gemittelt und einer einfaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung im Einflussfaktor Antikoagulanzen zugeführt. Die Ergebnisse, vergleichend für die zwei Automaten ADVIA™ 120 und H*1, sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 20: Signifikanz der Antikoagulanzen K₃- EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat auf die Messergebnisse der Blutzellzählung des ADVIA™ 120 und H*1, n = 10, * logarithmiert

Parameter	Einheit	Signifikanz (p)	
		ADVIA™ 120	H*1
WBC*	10 ⁹ l ⁻¹	p>0,05	p>0,05
RBC	10 ¹² l ⁻¹	p>0,05	p>0,05
HB	mmol l ⁻¹	p>0,05	p>0,05
HCT	l l ⁻¹	p<0,05	p<0,01
MCV	fl	p<0,001	p<0,001
MCH	fmol	p>0,05	p>0,05
MCHC	mmol l ⁻¹	p<0,001	p<0,001
CHCM	mmol l ⁻¹	p<0,001	p<0,001
RDW	%	p<0,001	p<0,001
HDW	mmol l ⁻¹	p<0,05	p<0,01
PLT*	10 ⁹ l ⁻¹	p<0,01	p<0,01
MPV	fl	p<0,01	p<0,001
PDW	%	p<0,05	p<0,001
PCT	%	p<0,001	p<0,01
RETI	%	p>0,05	-

Wie aus Tabelle 20 ersichtlich ist, werden nur für die Parameter WBC, RBC, HB, MCH und RETI keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Antikoagulanzen festgestellt.

Die folgende Tabelle enthält die Signifikanzen für die Blutzelldifferenzierung.

Tabelle 21: Signifikanz der Antikoagulanzen K₃- EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat auf die Messergebnisse der Blutzelldifferenzierung des ADVIA™ 120 und H*1, n = 10, * logarithmiert

Parameter	Einheit	Signifikanz (p)	
		ADVIA™ 120	H1
Neutrophile G.	%	p>0,05	p<0,05
Lymphozyten*	%	p>0,05	p>0,05
Monozyten*	%	p>0,05	p>0,05
Eosinophile G.*	%	p<0,01	p<0,01
Basophile G.*	%	p>0,05	p>0,05
LUC*	%	p<0,05	p>0,05
Neutrophile G.	10 ⁹ l ⁻¹	p>0,05	p<0,05
Lymphozyten*	10 ⁹ l ⁻¹	p>0,05	p>0,05
Monozyten*	10 ⁹ l ⁻¹	p>0,05	p>0,05
Eosinophile G.	10 ⁹ l ⁻¹	p<0,05	p<0,05
Basophile G.	10 ⁹ l ⁻¹	p>0,05	p>0,05
LUC	10 ⁹ l ⁻¹	p>0,05	p>0,05

Für die Parameter der Blutzelldifferenzierung werden für die absoluten Anteile der Eosinophilen Granulozyten schwach signifikante Unterschiede festgestellt.

Wird beim Vergleich der drei unterschiedlichen Antikoagulanzen eine Signifikanz festgestellt, erfolgt zur genaueren Differenzierung dieser Unterschiede eine paarweise Gegenüberstellung der Antikoagulanzen. Die statistische Auswertung wird mit Hilfe des t- Tests für verbundene Stichproben unter Anwendung eines vergleichsbezogenen Signifikanzniveaus nach der Bonferroni-Methode durchgeführt. Diese Methode kontrolliert die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten zufälliger Signifikanzen (p kleiner gleich 0,05). Um z. B. eine Signifikanz von $p \leq 0,05$ angeben zu können, muss für jeden Vergleich $p \leq 0,017$ ($0,05/3$) sein.

Folgende Tabelle verdeutlicht die angewandte Bonferroni- Methode bei drei Vergleichen.

Signifikanz	geprüft mit
$p \leq 0,001$	$p \leq 0,0003$
$p \leq 0,01$	$p \leq 0,003$
$p \leq 0,05$	$p \leq 0,017$

Die nachstehende Tabelle zeigt für die Parameter mit signifikanten Unterschieden die Ergebnisse des paarweisen Antikoagulanzenvergleichs.

Tabelle 22: Vergleichende Darstellung der Antikoagulanzen K₃- EDTA, Li- Heparin und Na- Citrat unter Angabe der Signifikanz nach der Bonferroni-Methode und des relativen Unterschieds (%) beim ADVIA™ 120, n = 10, * logarithmiert

		EDTA/ Heparin	EDTA/ Citrat	Heparin/ Citrat
HCT	Signifikanz	p>0,05	p<0,05	p>0,05
	Relativer Unterschied (%)	-	2,05	-
MCV	Signifikanz	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	Relativer Unterschied (%)	1,25	2,52	1,29
MCHC	Signifikanz	p<0,01	p<0,001	p<0,05
	Relativer Unterschied (%)	-1,04	-2,14	-1,11
RDW	Signifikanz	p<0,01	p<0,01	p<0,05
	Relativer Unterschied (%)	1,13	0,88	0,25
HDW	Signifikanz	p>0,05	p>0,05	p<0,001
	Relativer Unterschied (%)	-	-	1,80
PLT*	Signifikanz	p<0,01	p<0,05	p≤0,001
	Relativer Unterschied (%)	67,5	26,5	83
MPV	Signifikanz	p<0,05	p<0,001	p>0,05
	Relativer Unterschied (%)	14,13	12,35	-

Wie aus Tabelle 22 ersichtlich ist, zeigen sich bei Verwendung der verschiedenen Gerinnungshemmer beim MCV hochsignifikante und beim RDW signifikante Unterschiede. Für den Parameter PLT können beim Vergleich von Citrat- und EDTA-antikoagulierten Proben mit Li- Heparin signifikante bzw. hochsignifikante

Unterschiede mit relativen Unterschieden bis zu 83 % festgestellt werden. Das MPV zeigt für den Vergleich EDTA/ Heparin und EDTA/ Citrat signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede, währenddessen beim Vergleich Heparin/ Citrat keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind.

6.5 Verlaufsuntersuchungen

In diesem Abschnitt wird dargestellt, welchen Einfluss die Lagerungstemperatur und die Lagerungsdauer von Katzenblutproben auf die Messergebnisse des ADVIATM 120 haben. Verwendung hierfür finden 10 Katzenblutproben, die zur Antikoagulation mit EDTA versetzt werden. Diese Blutproben werden bei Raumtemperatur bzw. im Kühlschrank aufbewahrt. Die Untersuchung erfolgt 0, 3, 6, 12, 24, 36, 48 und 72 Stunden nach Blutentnahme. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der zweifaktoriellen Varianzanalyse für die wichtigsten Parameter der Blutzellzählung, -differenzierung und Retikulozytenzählung dargestellt.

6.5.1 Blutzellzählung

In der folgenden Tabelle sind die Signifikanzen der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit den Einflussfaktoren „Temperatur“ und „Zeit“ für die Parameter der Blutzellzählung aufgeführt.

Tabelle 23: Einfluss der Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur auf die ADVIA™ 120 Messergebnisse von Katzenblutproben; n = 10; Softwareversion 4; p = Signifikanz, * logarithmiert

Parameter	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und –dauer
WBC*	p>0,05	p>0,05	p>0,05
RBC	p>0,05	p<0,001	p>0,05
HB	p>0,05	p<0,01	p>0,05
HCT	p>0,05	p<0,001	p<0,01
MCV	p>0,05	p<0,001	p<0,001
MCH	p>0,05	p<0,001	p>0,05
MCHC	p>0,05	p<0,001	p>0,05
RDW	p>0,05	p<0,001	p<0,001
HDW	p>0,05	p<0,001	p<0,001
PLT*	p<0,01	p<0,01	p<0,01
MPV	p<0,01	p>0,05	p>0,05
PDW	p<0,01	p<0,001	p>0,05
MPC*	p>0,05	p<0,001	p>0,05
PCT*	p<0,01	p<0,001	p<0,01

Wie aus Tabelle 23 ersichtlich ist, wird die Leukozytenzählung weder durch die Lagerungstemperatur noch durch die Lagerungsdauer beeinflusst. Bei den Parametern des roten Blutbildes kann festgestellt werden, dass die Lagerungsdauer einen größeren Einfluss auf das Messergebnis hat als die Lagerungstemperatur. Hier werden bezüglich der Lagerungsdauer hochsignifikante Unterschiede zwischen den Messergebnissen festgestellt. Bei der Bewertung der Signifikanzen muss beachtet werden, dass bereits geringfügige Abweichungen der Parameter mit geringen Streuungen um den Mittelwert signifikante Unterschiede der Messergebnisse erzeugen können. Bei Parametern mit großen Streuungen um den Mittelwert kann der umgekehrte Fall eintreten. Für die Parameter der

Thrombozytenzählung ist abzuleiten, dass sich sowohl die Lagerungsdauer, als auch die Lagerungstemperatur auf die Messergebnisse auswirken. Eine Ausnahme hiervon bildet das MPV in Hinblick auf die Lagerungsdauer und das MPC bezüglich der Lagerungstemperatur. Hier zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Im Folgenden soll mit Hilfe von Graphiken der Verlauf ausgewählter Parameter in Abhängigkeit von der Zeit gezeigt werden. Zu jedem Messzeitpunkt wird die mittlere Abweichung der Messwerte zum Ausgangsmittelwert und der dazugehörigen mittleren absoluten Abweichung für beide Lagerungstemperaturen berechnet. In der folgenden Graphik sind die Messergebnisse der Leukozytenzählung dargestellt.

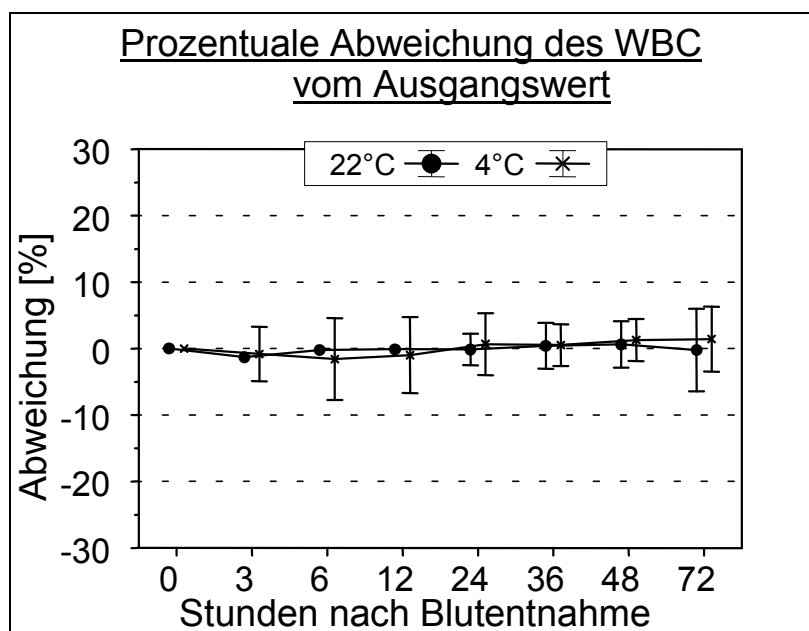


Abbildung 22: Verlauf der prozentualen Abweichung der Leukozytenzahl WBC vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Die Leukozytenzahl erweist sich unabhängig von der Lagerungstemperatur und -dauer über 72 Stunden als sehr stabil. Ähnliche Ergebnisse können für die Erythrozytenzählung und Hämoglobinmessung festgestellt werden.

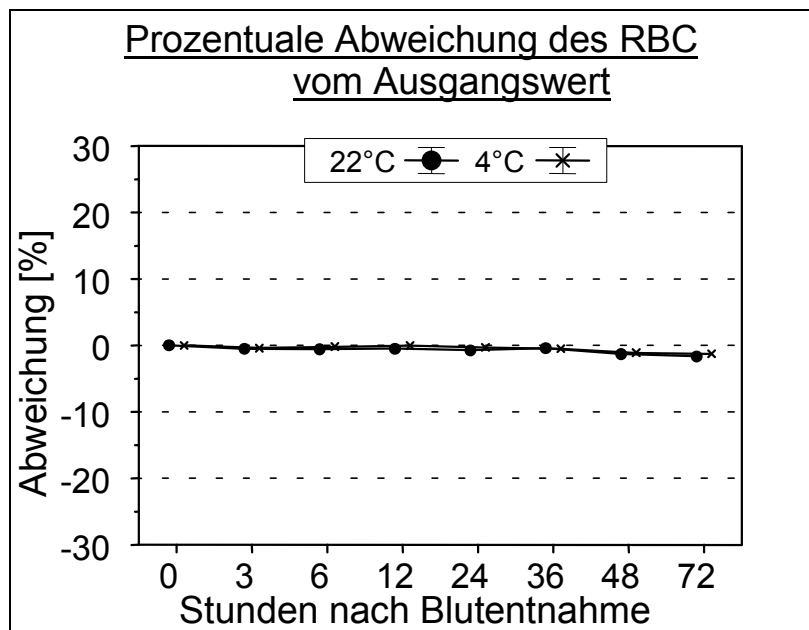


Abbildung 23: Verlauf der prozentualen Abweichung der Erythrozytenzahl RBC vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

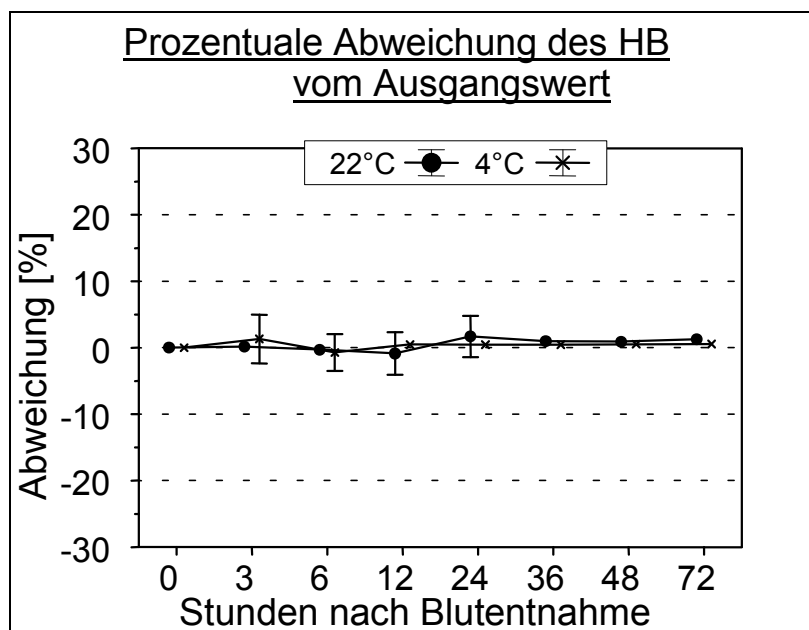


Abbildung 24: Verlauf der prozentualen Abweichung des Hämoglobingehalts HB vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Die Abbildungen 23 und 24 verdeutlichen, dass die Parameter RBC und HB über 72 Stunden mit hoher Konstanz gemessen werden. Die berechnete hohe Signifikanz trotz geringer Abweichung der Erythrozyten für die Lagerungsdauer erklärt sich aufgrund der geringfügigen Streuung vom Mittelwert und ist klinisch nicht relevant.

In der folgenden Abbildung sind der Einfluss der Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur auf den Hämatokritwert HCT dargestellt.

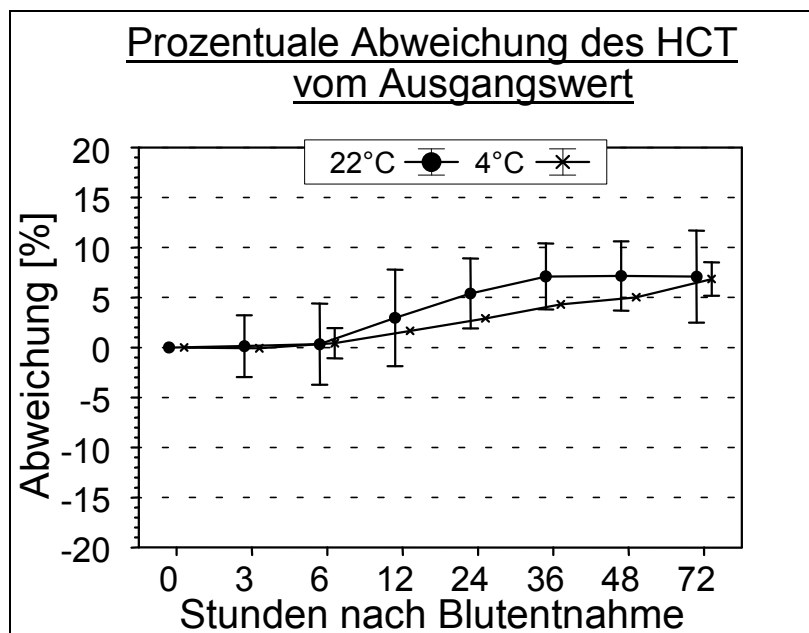


Abbildung 25: Verlauf der prozentualen Abweichung des Hämatokritwertes HCT vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Die Abbildung 25 zeigt zwischen den Zeitpunkten 6 Stunden nach Blutentnahme und 72 Stunden nach Blutentnahme einen deutlichen Anstieg des Hämatokritwertes um mehr als 6 %. Die bei Raumtemperatur gelagerten Blutproben erreichen diese maximale Abweichung schon nach 36 Stunden, währenddessen die im Kühlschrank aufbewahrten Blutproben einen stetigen Anstieg verzeichnen. Die ungekühlten Proben weisen höhere Standardabweichungen auf.

Die Ergebnisse der Verlaufsuntersuchung für die Erythrozytenindizes werden in den folgenden Abbildungen 26 - 28 dargestellt.

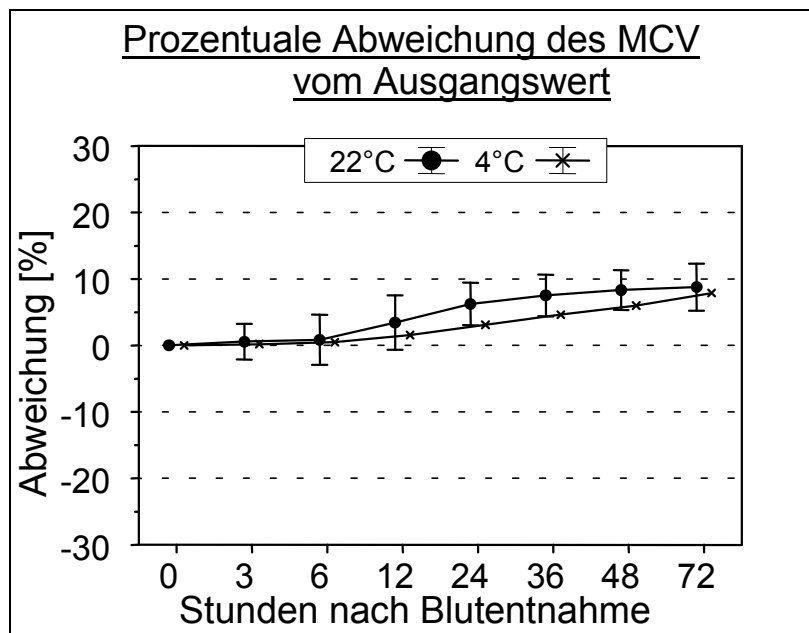


Abbildung 26: Verlauf der prozentualen Abweichung des MCV vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

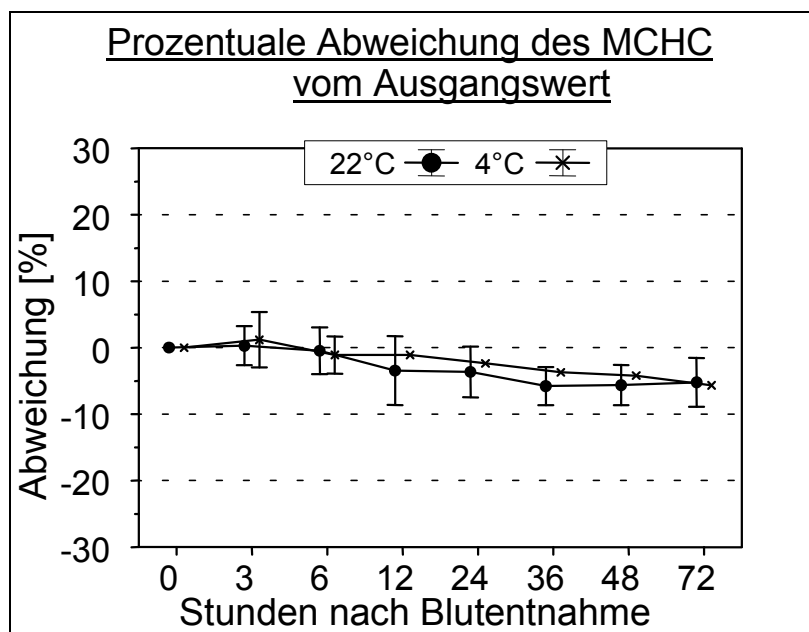


Abbildung 27: Verlauf der prozentualen Abweichung des MCHC vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

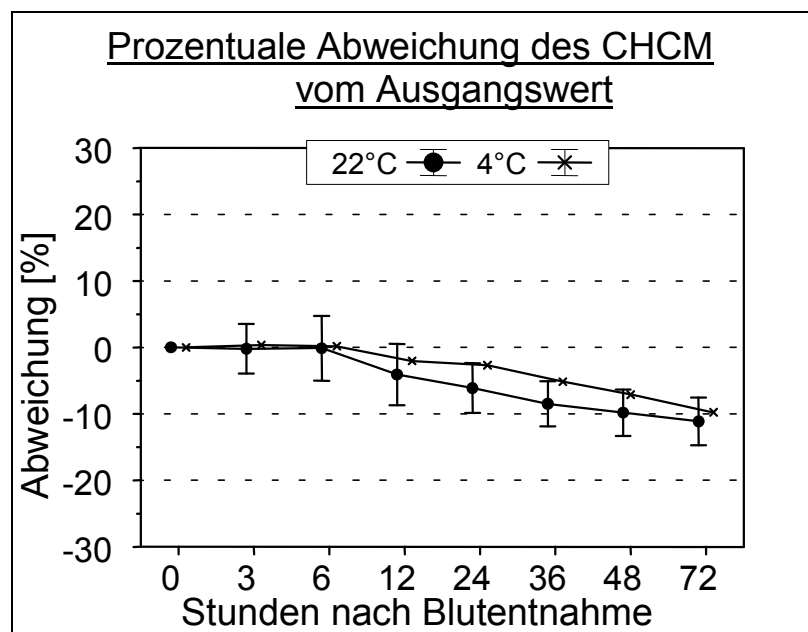


Abbildung 28: Verlauf der prozentualen Abweichung des CHCM vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Das Mittlere Erythrozytenvolumen MCV (Abb. 26) zeigt einen ähnlichen Kurvenverlauf wie der Hämatokritwert HCT. Die ersten 6 Stunden kann das Erythrozytenvolumen mit hoher Stabilität gemessen werden. Danach steigt das Erythrozytenvolumen kontinuierlich an und nach 72 Stunden kann eine maximale Abweichung von 9 % bei den bei Raumtemperatur gelagerten Proben bestimmt werden. Einen fast spiegelbildlichen Kurvenverlauf zeigen der direkt an der Einzelzelle gemessene Hämoglobingehalt CHCM und die errechnete Mittlere Hämoglobinkonzentration MCHC. 3 Tage nach Blutentnahme finden sich bezogen auf den Ausgangswert um etwa 10 % (CHCM) bzw. 6 % (MCHC) erniedrigte Messergebnisse.

Die folgenden Abbildungen zeigen den Einfluss von Lagerungstemperatur und Lagerungsdauer auf die Erythrozyten- (RDW) und Hämoglobinverteilungsbreite (HDW).

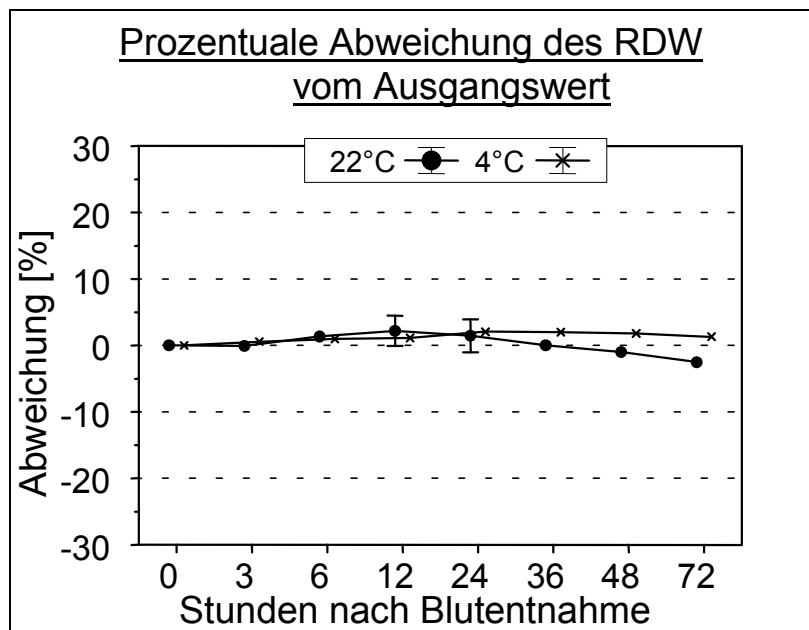


Abbildung 29: Verlauf der prozentualen Abweichung der Erythrozytenverteilungsbreite RDW vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

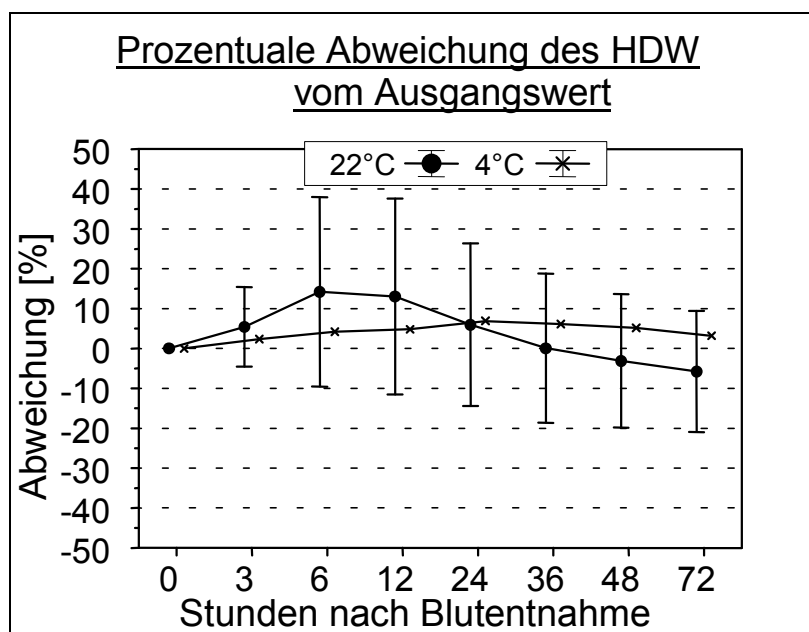


Abbildung 30: Verlauf der prozentualen Abweichung der Hämoglobinverteilungsbreite HDW vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n 10

Die Messung der Erythrozytenverteilungsbreite RDW (Abb. 29) erweist sich über 24 Stunden als sehr stabil. Die maximale Abweichung vom Ausgangswert beträgt nach 72 Stunden ca. +2 % (4° C) und –2 % (22° C). Wie aus Abbildung 30 ersichtlich ist, können für die Hämoglobinverbreitungsbreite deutliche temperaturabhängige Unterschiede festgestellt werden. Auffällig ist die hohe Streuung um den Mittelwert der bei Raumtemperatur gelagerten Proben. Sie zeigen 6 Stunden nach Blutentnahme um ca. 15 % erhöhte Werte, die im Verlauf der Untersuchung auf um ca. 5 % erniedrigte Werte nach 72 Stunden abfallen. Die maximale Abweichung für die gekühlten Proben beträgt 8 % nach 24 Stunden.

Auf der folgenden Abbildung ist die Stabilität der Thrombozytenzahl PLT graphisch dargestellt.

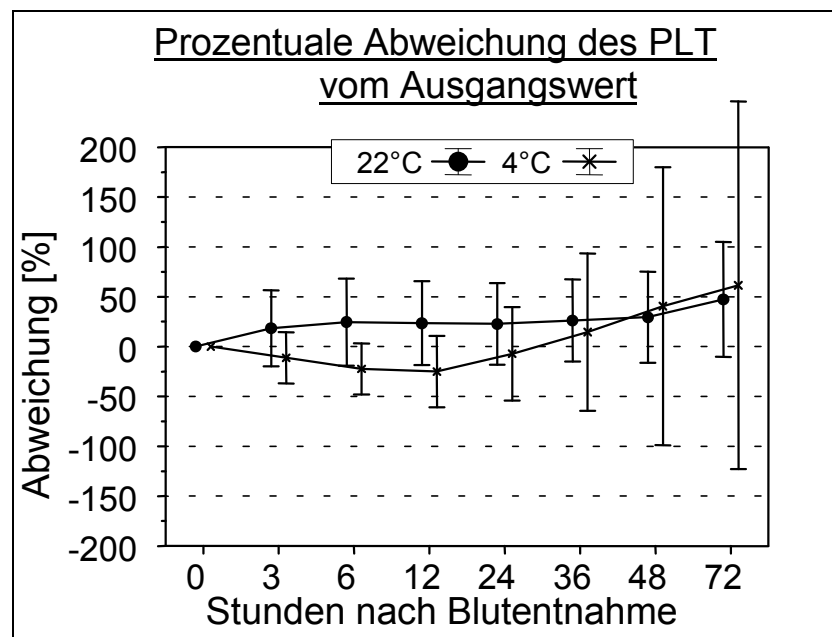


Abbildung 31: Verlauf der prozentualen Abweichung der Thrombozytenzahl PLT vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Bei der Interpretation von Abbildung 31 ist die aufgrund der hohen Streuung um den Mittelwert veränderte Skalierung zu beachten. Bereits drei Stunden nach Blutentnahme kann eine deutliche Beeinflussung der Messergebnisse durch die unterschiedliche Lagerungstemperatur und die Blutalterung festgestellt werden. Die bei Raumtemperatur gelagerten Proben weisen um ca. 20 - 25 % erhöhte Messwerte auf. Im Mittel bleibt diese Abweichung bis 48 Stunden nach Entnahme konstant, steigt dann aber auf bis zu 50 %, bezogen auf den Nullwert. Die gekühlten Proben

zeigen zu Anfang eine gegenläufigen Kurvenverlauf. 3 Stunden nach Blutentnahme werden ca. 12 % niedrigere Thrombozytenzahlen gemessen. Die niedrigsten Werte treten sechs Stunden später auf. Danach ist im Mittel ein Anstieg der Plättchenzahlen zu verzeichnen, der beim letzten Messzeitpunkt eine maximale Abweichung von 65 % zeigt. Problematisch für die klinische Interpretation der Daten ist neben der hohen Abweichung die hohe Streuung um den Mittelwert.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Kurvenverläufe des Mittleren Plättchenvolumens (MPV), der Plättchenverteilungsbreite (PDW), des Thrombokrits (PCT) und der Mittleren Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten (MPC).

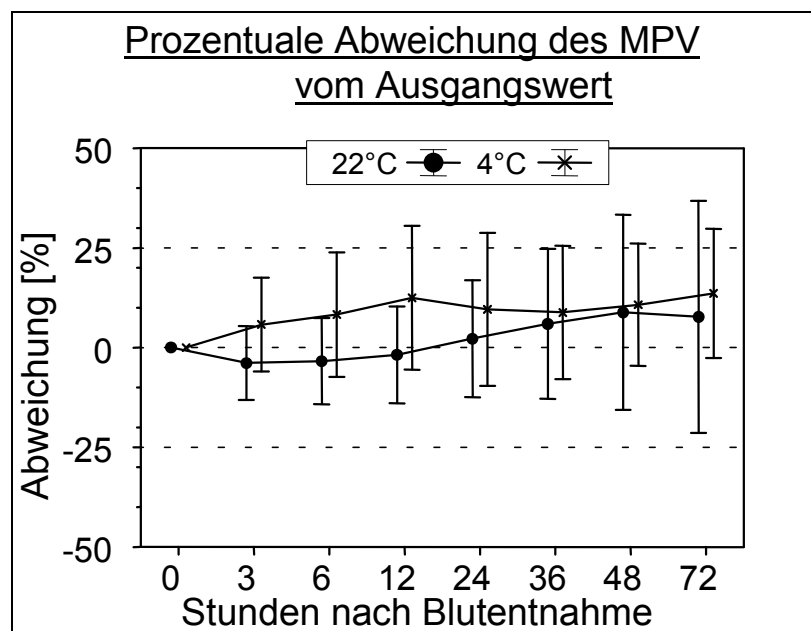


Abbildung 32: Verlauf der prozentualen Abweichung des Mittleren Plättchenvolumen MPV vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

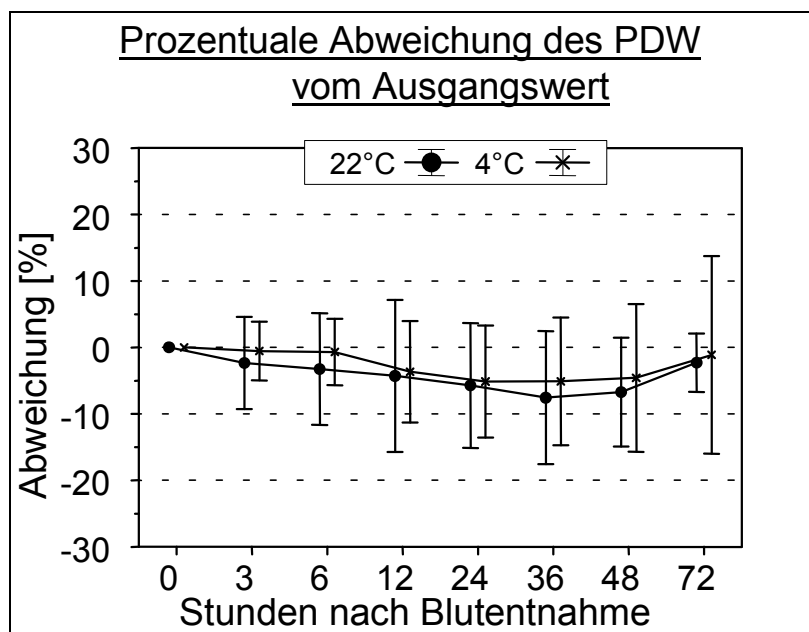


Abbildung 33: Verlauf der prozentualen Abweichung der Plättchenverteilungsbreite PDW vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

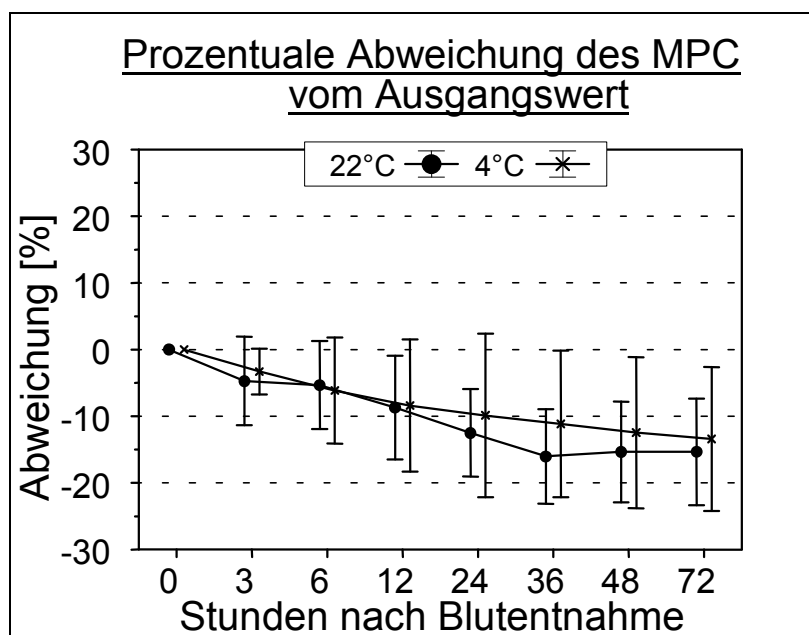


Abbildung 34: Verlauf der prozentualen Abweichung der Mittleren Konzentration der Inneren Bestandteile der Thrombozyten MPC vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Wie aus Abbildung 32 ersichtlich ist, zeigt das Mittlere Thrombozytenvolumen bei 22° C Lagertemperatur über ca. 20 Stunden im Mittel um etwa 4 % erniedrigte Werte. Danach steigt der MPV um ca. 8 % im Vergleich zum Ausgangswert an. Die

bei Kühlschranktemperatur aufbewahrten Proben zeigen nach drei Stunden eine Zunahme der Messergebnisse um ca. 6 % vom Ausgangswert und bewegen sich dann bis zum Ende der Untersuchungen zwischen 8 % und 12 % Abweichung.

Abbildung 33 zeigt, dass die Kurvenverläufe für 4° C und 22° C für den Parameter PDW einen ähnlichen Verlauf aufweisen. Während die gekühlten Proben die ersten 6 Stunden stabile Ergebnisse zeigen, fallen die Messwerte der ungekühlten Proben stetig auf maximal 8 % nach 36 Stunden.

In der Abbildung 34 ist zu erkennen, dass für den Parameter MPC die Lagerungsdauer einen deutlichen Einfluss auf die Resultate ausübt. Der Einfluss der Lagerungstemperatur ist nicht signifikant. Die Lagerung bedingt einen kontinuierlichen Abfall der Mittleren Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten für die bei Zimmertemperatur gelagerten Proben bereits nach 36 Stunden und für die gekühlten Proben nach 72 Stunden um 14 - 15 %.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Blutalterung für die Blutzelldifferenzierung dargestellt.

6.5.2 Blutzelldifferenzierung

In Tabelle 24 sind die Signifikanzen der zweifaktoriellen Varianzanalyse zur Untersuchung des Einfluss „Lagerungstemperatur“ und „Lagerungsdauer“ für die Parameter der Blutzelldifferenzierung aufgelistet.

Tabelle 24: Einfluss der Lagerdauer und Lagertemperatur auf die ADVIA™ 120 Messergebnisse von Katzenblutproben; n = 10; Softwareversion 4; p = Signifikanz

Parameter	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und -dauer
Neutrophile G.	p>0,05	p<0,001	p<0,001
Lymphozyten	p<0,05	p>0,05	p>0,05
Monozyten	p<0,01	p<0,001	p<0,001
Eosinophile G.	p>0,05	p<0,001	p<0,001
Basophile G.	p>0,05	p<0,001	p>0,05
LUC	p<0,05	p<0,001	p>0,05

Aus Tabelle 24 ist zu entnehmen, dass für die Monozyten, Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten hochsignifikante Unterschiede bezüglich des Einflussfaktors „Lagerungsdauer“ und der Wechselwirkung „Lagerungsdauer und -temperatur“ bestehen. Die Lymphozyten zeigen einen schwach signifikanten Einfluss der Lagerungstemperatur auf die Messergebnisse, während die Zellalterung für die Lymphozytenmessung statistisch keine signifikanten Unterschiede bedingt. Wie auch schon bei der Blutzellzählung erläutert, muss bei der Beurteilung der Signifikanzen berücksichtigt werden, dass geringfügige Abweichungen bei Parametern mit kleinen Streuungen um den Mittelwert signifikante Unterschiede erzeugen können und umgekehrt.

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der absoluten Neutrophilenzahlen über 72 Stunden bei 4° C und 22° C.

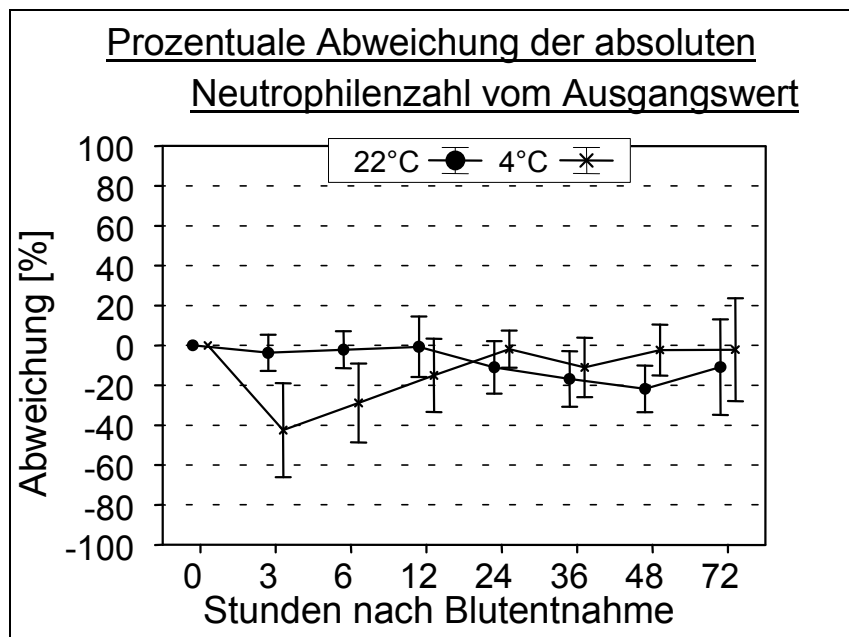


Abbildung 35: Verlauf der prozentualen Abweichung der absoluten Neutrophilenzahl vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Die Stabilität der Neutrophilenzahl ist stark abhängig von der Lagerungstemperatur. Die Messwerte der bei Zimmertemperatur aufbewahrten Proben können die ersten 12 - 24 Stunden mit akzeptabler Konstanz gemessen werden. Danach kommt es zu einem Abfall der Werte um maximal 20 % des Ausgangswerts. Für die gekühlten Proben fällt drei Stunden nach Blutentnahme ein dramatischer Abfall der Ergebnisse auf. Die um 40 % vom Ausgangswert erniedrigten Ergebnisse steigen nachfolgend wieder an und erreichen 24 Stunden nach Blutentnahme fast wieder den Ausgangswert.

Für die Eosinophilenzahlen stellt sich die Verlaufsuntersuchung folgendermaßen dar.

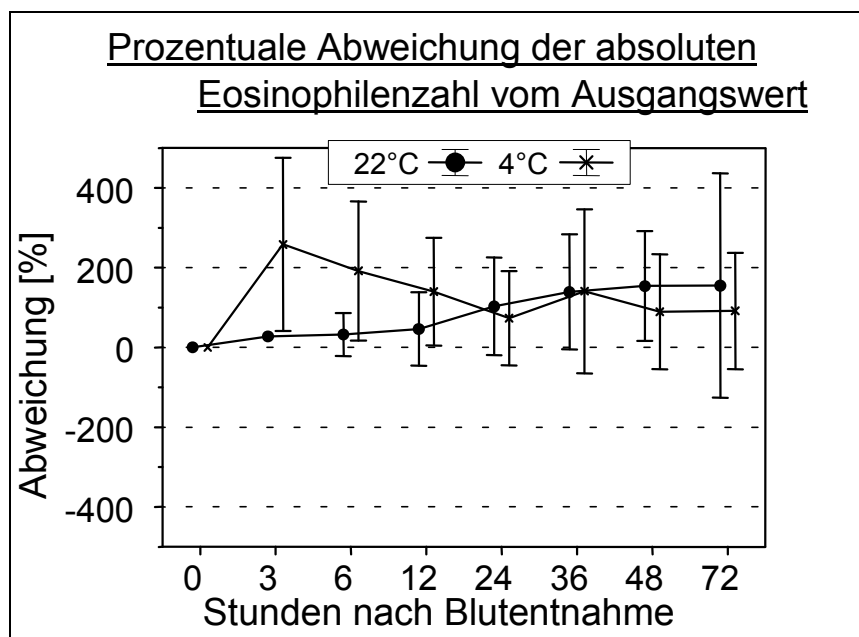


Abbildung 36: Verlauf der prozentualen Abweichung der absoluten Eosinophilenzahl vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Aufgrund der erheblichen Streuungen und der geringen Zellzahl führt die prozentuale Darstellung zu einer Verzerrung der Skalierung. Wie aus Abbildung 36 zu entnehmen ist, steigen die Werte der ungekühlten Proben kontinuierlich über den Messzeitraum an und erreichen nach 72 Stunden im Mittel einen über 160 % erhöhten Messwert. Bereits nach 6 Stunden muss mit einem 26 % erhöhten Ergebnis gerechnet werden. Der Kurvenverlauf der gekühlten Blutproben mit einem massivem Anstieg der Eosinophilen Granulozyten nach 3 Stunden um etwa 250 % im Vergleich zum Ausgangswert und einem anschließendem Abfall auf ca. 70 % nach 24 Stunden ist dem Verlauf der Neutrophilen Granulozyten der gekühlten Probe gegenläufig. Die Skalierung ist durch die geringe Zellzahl verzerrt. Auf das Problem der Messung der Eosinophilen Granulozyten wird an anderer Stelle eingegangen.

Die Lymphozyten verhalten sich in Abhängigkeit von Dauer und Temperatur wie folgt abgebildet.

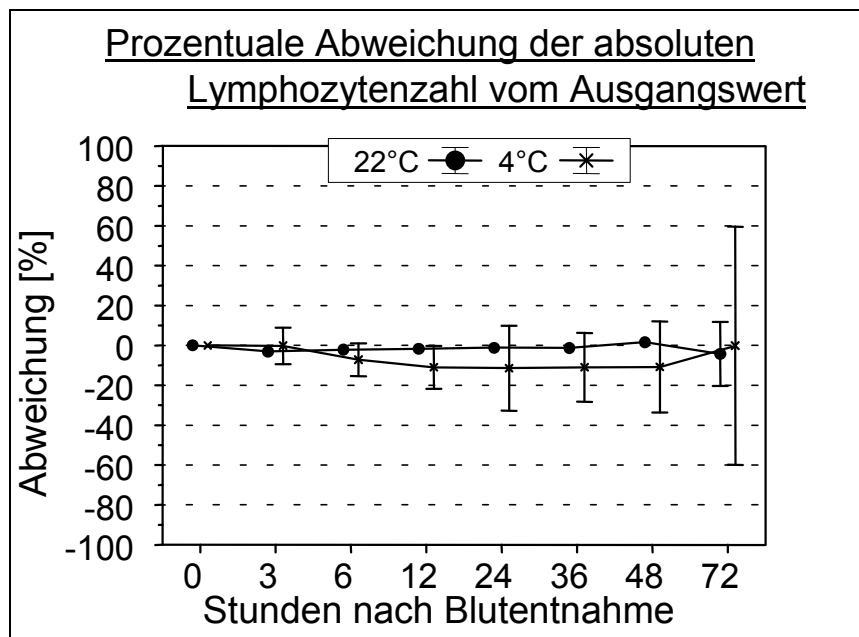


Abbildung 37: Verlauf der prozentualen Abweichung der absoluten Lymphozytenzahl vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Die Lymphozyten bleiben bei 22° C- Lagerung mit einer maximalen Abweichung von 4 % nach 72 Stunden über die Zeit sehr konstant. Bei 4° C ist neben einem Abfall der Werte (maximale Abweichung 11 %) eine zunehmende Streuung um die Mittelwerte zu beobachten.

In Abbildung 38 ist der zeitliche Verlauf der Monozyten dargestellt.

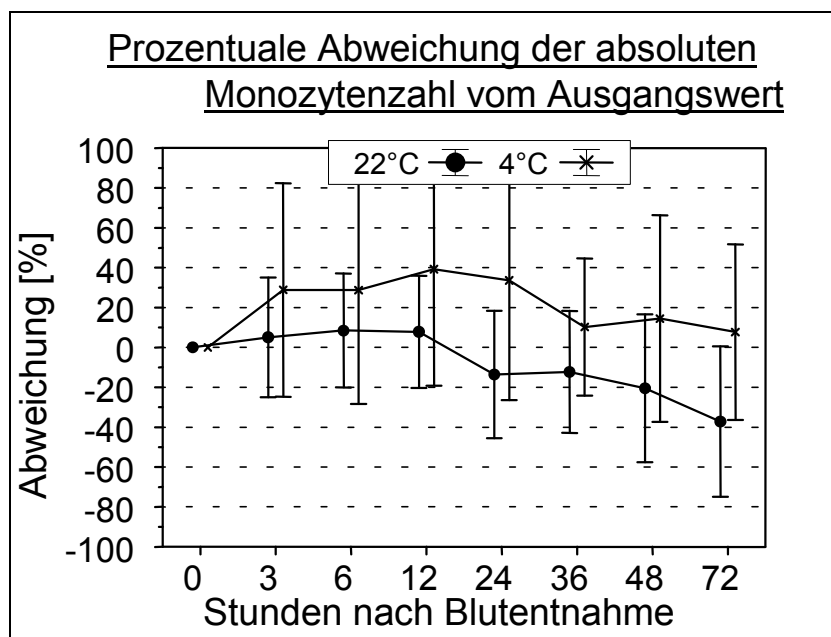


Abbildung 38: Verlauf der prozentualen Abweichung der absoluten Monozytenzahl vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen, n = 10

Die Monozyten zeigen bei 4° C und 22° C nach 3 Stunden bis zum Ende der Messreihe einen annähernd parallelen Verlauf. Während allerdings für die ungekühlten Proben nach 3 Stunden eine Abweichung von ca. 6 - 8 % festgestellt werden kann, führt die Lagerung bei Kühlschranktemperatur zu einer Erhöhung der Messwerte um ca. 30 %. Weiterhin fällt die höhere Streuung um den Mittelwert bei Kühlschranklagerung auf.

6.5.3 Retikulozytenzählung

Die folgende Tabelle enthält die Ergebnisse der Blutalterung für die Retikulozytenzählung.

Tabelle 25: Einfluss der Lagerdauer und Lagertemperatur auf die ADVIA™ 120 Messergebnisse von Katzenblutproben; n = 10; Softwareversion 4; p = Signifikanz

Parameter	Einfluss der Lagertemperatur	Einfluss der Lagerdauer	Wechselwirkung Lagertemperatur und -dauer
Retikulozyten %	p>0,05	p<0,0001	p<0,0001
Retikulozyten	p>0,05	p<0,0001	p<0,0001

Für die Retikulozytenzählung wird bezüglich der Lagerungsdauer und der Wechselwirkung Lagerungsdauer und -temperatur ein hochsignifikanter Unterschied festgestellt. Die Lagerungstemperatur hat keinen signifikanten Einfluss auf das Messergebnis. Bei der Interpretation der Signifikanzen ist zu beachten, dass Parameter mit großen Streuungen um den Mittelwert nicht signifikante Unterschiede der Messergebnisse erzeugen können.

Die folgende Abbildung stellt den zeitlichen Verlauf der absoluten Retikulozytenzahl dar.

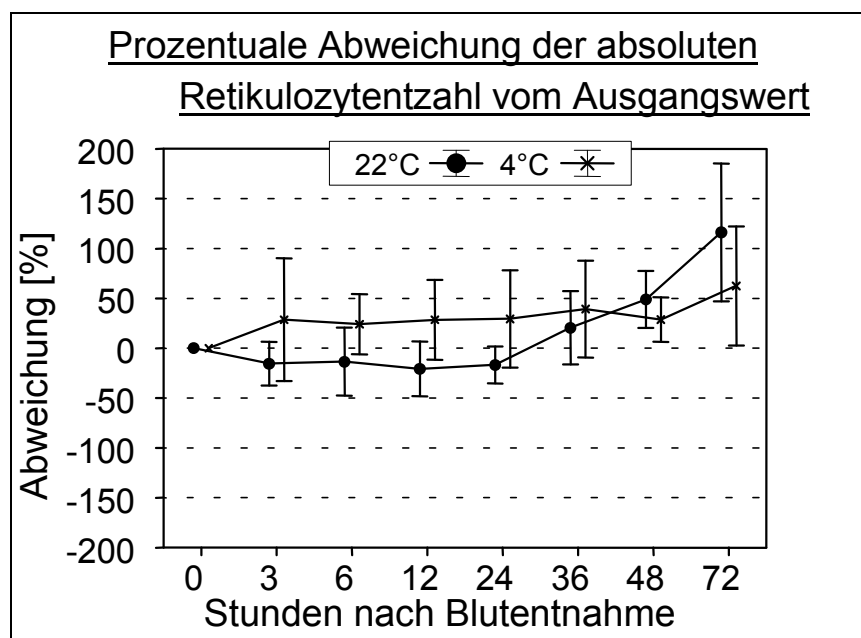


Abbildung 39: Verlauf der prozentualen Abweichung der absoluten Retikulozytenzahl vom Ausgangswert bei verschiedenen Lagerungstemperaturen

Wie aus Abbildung 39 ersichtlich, zeigen die bei Kühlschranktemperatur gelagerten Blutproben bereits nach 3 Stunden deutlich erhöhte Werte. Die Abweichung von 25 % bleibt bis 48 Stunden nach Blutentnahme konstant. Danach steigt die Abweichung auf bis zu 62 %. Im Gegensatz dazu weisen die bei 22° C aufbewahrten Proben nach 3 Stunden um knapp 20 % erniedrigte Werte auf. Nach 24 Stunden kann ein Anstieg der Messwerte verzeichnet werden, die nach 72 Stunden um mehr als 100 % vom Ausgangswert abweichen.

6.6 2 D- Thrombozytenanalyse

Das folgende Kapitel stellt den Einfluss des Agglutinationsgrades von 266 feline Blutproben auf die Parameter MPV und MPC dar. Durch visuelle Beurteilung der im ca. 60° Winkel aufsteigenden Punktwolke im Leukogramm wird der Grad der Agglutination bestimmt. Die Ergebnisse sind in folgender Abbildung graphisch dargestellt.

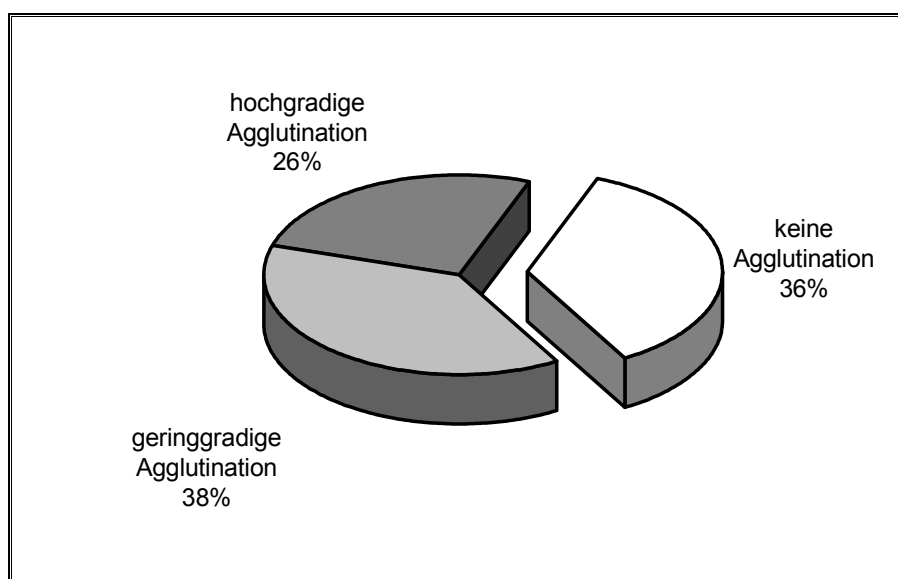


Abbildung 40: Ergebnisse der visuellen Beurteilung von Thrombozytenagglutinen im Leukogramm, Graduierung in geringgradige, hochgradige und keine Agglutination, ADVIA™ 120, Angabe in Prozent, n = 266

Nur 36 % der Blutproben weisen makroskopisch sichtbar keine Agglutinate auf. In Abhängigkeit des Agglutinationsgrades werden Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung (S), Spannweite und Signifikanz (p) ermittelt. Die Resultate sind in den beiden nachfolgenden Tabellen getrennt für das Mittlere Plättchenvolumen (MPV) und die Mittlere Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten (MPC) aufgeführt.

Tabelle 26: Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV, fl) nicht, geringgradig und hochgradig agglutiniierter Blutproben und Angabe von Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$), Spannweite (Min., Max.) und Signifikanz (p), n = 266, Tierart Katze, (n.s. nicht signifikant)

Agglutination	Parameter	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			Minimum	Maximum	p
Geringgradig	MPV (fl)	16,28	$\pm$	1,86	10,73	29,87	p>0,05
Hochgradig	MPV (fl)	16,64	$\pm$	1,47	11,93	27,83	p>0,05
Keine	MPV (fl)	15,63	$\pm$	2,08	8,73	29,77	p>0,05

Wie aus der Tabelle 26 hervorgeht, weisen die agglutinierten Proben im Vergleich zu den nicht agglutinierten Proben einen etwas höheren MPV ($> 16,28$ fl) auf, allerdings sind die Unterschiede aufgrund der hohen Standardabweichungen, wie aus der folgenden Graphik deutlich hervorgeht, nicht signifikant.

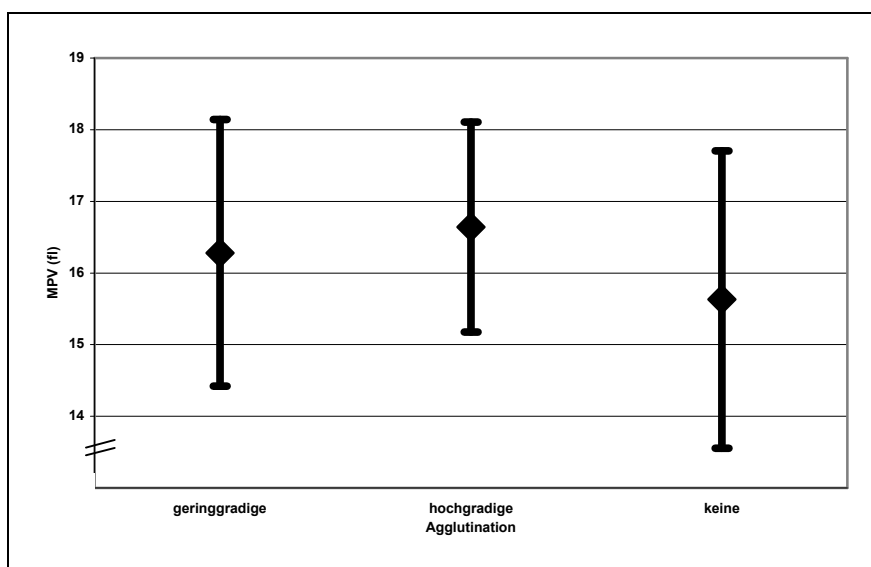


Abbildung 41: Mittleres Thrombozytenvolumen (MPV) und Standardabweichung der nicht, geringgradig und hochgradig agglutinierten Blutproben, n = 266, Tierart Katze

Einen deutlicheren Einfluss des Agglutinationsgrades kann für den Parameter MPC festgestellt werden, wie folgender Tabelle zu entnehmen ist.

Tabelle 27: Mittlere Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten (MPC, g dl⁻¹) nicht, geringgradig und hochgradig agglutinierten Blutproben und Angabe von Mittelwert $\pm$ Standardabweichung ($\bar{x} \pm S$), Spannweite (Min., Max.) und Signifikanz (p), n = 266, Tierart Katze

Agglutination	Parameter	Mittelwert $\pm$ Standardabweichung $\bar{x} \pm S$			Minimum	Maximum	p
Geringgradig	MPC g dl-1	21,45	$\pm$	1,36	16,03	26,80	p<0,01
Hochgradig	MPC g dl-1	19,04	$\pm$	0,70	15,93	24,53	p<0,01
keine	MPC g dl-1	23,72	$\pm$	1,23	18,00	31,00	p<0,01

Für Blutproben mit hochgradiger Agglutination kann mit einem MPC von 19,04 g dl⁻¹ ein signifikant niedrigerer Wert wie bei nicht agglutinierten Proben (23,72 g dl⁻¹) dokumentiert werden. Die folgende Graphik verdeutlicht die signifikanten Unterschiede der Mittleren Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten (MPC) in Abhängigkeit vom Agglutinationsgrad.

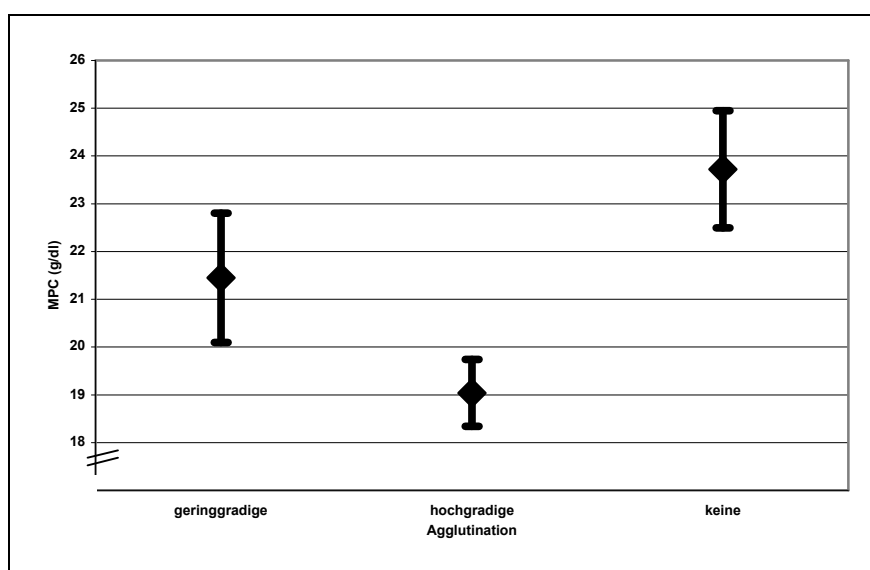


Abbildung 42: Mittlere Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten (MPC) und Standardabweichung der nicht, geringgradig und hochgradig agglutinierten Blutproben, n = 266, Tierart Katze

Wie die Graphik zeigt, sind sowohl für die geringgradig als auch die hochgradig agglutinierten Proben signifikante Unterschiede zu den nicht agglutinierten Proben zu verzeichnen.

7 DISKUSSION

7.1 Präzision

Die Wiederholungsmessungen dienen der Überprüfung der Präzision von Messergebnissen und damit der Abschätzung des Zufallsfehlers einer Methode (WESTGARD et al., 1974). Die Reproduzierbarkeit einer Bestimmungsmethode ist unabdingbare Voraussetzung für die Verwendung des betreffenden Parameters in der Diagnostik (GOWENLOCK, 1969). DÖRNER et al. (1993) erwarten von einem modernen Hämatologiesystem für alle Zellen Variationskoeffizienten $\leq 3\%$ (DÖRNER et al., 1993). Die Ergebnisse der Präzision innerhalb der Serie und über verschiedene Serien hinweg werden für die Parameter der Blutzellzählung, der Retikulozytenzählung und der Blutzelldifferenzierung im Folgenden getrennt abgehandelt.

7.1.1 Präzision der Blutzellzählung

Für die Leukozytenzählung ergibt sich beim ADVIA™ 120 eine gute Präzision von 2,85 %. Im Vergleich dazu weist der F800 einen deutlich höheren CV von 9,12 % für die Leukozytenzählung auf. In Übereinstimmung mit der Literatur wird hier das Problem der Leukozytenzählung mit Widerstandmessgeräten bei Katzen deutlich. Die häufig bei der Katze auftretenden Thrombozytenagglutinate (HART und NOLTE, 1991; MISCHKE et al., 1995; TVEDTEN, 1993c) können zum einen zu Pseudoleukozytosen durch fälschliches Erfassen von Thrombozytenagglutinaten (MISCHKE et al., 1995; TVEDTEN, 1993a) und zum anderen zu Pseudoleukopenien aufgrund weggefangener Leukozyten in Agglomeratverbänden führen (TVEDTEN, 1993a).

Diese Problematik spiegelt sich auch in der schlechten Präzision von 13,8 % für den Parameter PLT beim F800 wider. Hier können einerseits aufgrund der Bildung von Agglutinaten falsch niedrige Thrombozytenzahlen gemessen werden (HART und NOLTE, 1991; MISCHKE et al., 1995; PFEIL und GENSCHOW, 1987; TVEDTEN, 1993a) und andererseits können kleine Erythrozyten als Thrombozyten gemessen werden und damit eine Erhöhung der Thrombozytenzahl verursachen (HART und NOLTE, 1991; MISCHKE et al., 1995; PFEIL und GENSCHOW, 1987; WEISER und KOCIBA, 1983). In diesem Zusammenhang ist auch der höhere Variationskoeffizient

des MPV von 6,15 % beim F800 zu erklären. Für den ADVIA™ 120 mit seiner verbesserten Messtechnik ergeben sich deutlich bessere Präzisionen für den Parameter PLT (CV = 6,2 %) und gute Präzisionen für den Parameter MPV (CV = 2,25 %). Deutlich schlechter schneidet der H*1 (CV = 11,23 %) ab. SUCHFORT (1998) ermittelt für die Thrombozytenzählung beim H*1 einen CV von 4,6 % und beim F800 einen CV von 25,7 %. Für den Parameter MPV ergibt sich für den H*1 ein Variationskoeffizient von 4 % und für den F800 von 30,1 % (SUCHFORT, 1998).

Für die anderen Parameter der Blutzellzählung werden für den ADVIA™ 120 sehr gute Variationskoeffizienten ermittelt, die unter denen von DÖRNER et al. (1993) für Automaten geforderten 3 % liegen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass mit dem ADVIA™ 120 sehr gute bis gute Präzisionen mit Ausnahme des Parameters PLT erzielt werden. Unter Berücksichtigung der Speziesbesonderheit der Katze ist die erreichte Präzision für den Parameter PLT jedoch akzeptabel.

7.1.2 Präzision der Blutzelldifferenzierung

KOEPKE und ROSS (1985) setzen bei einem Blutzellanalyser arbeitshypothetisch für die Leukozytendifferenzierung einen Leistungsstandard voraus, der bezüglich der Präzision und Richtigkeit besser oder zumindest ebenbürtig einer manuellen Differenzierung sein muss (KOEPKE und ROSS, 1985). Als Richtlinie für die zu erwartende Präzision der manuellen Differenzierung dienen die von BUTTARELLO (1992) ermittelten Resultate eines 800- Zellen- Differenzialblutbildes beim Menschen. Sie sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Tabelle 28: Variationskoeffizienten CV des manuellen Differenzialblutbildes beim Menschen (BUTTARELLO et al., 1992)

	BUTTARELLO et al. (1992) CV %
Neutrophile G.	5,67
Lymphozyten	8,64
Monozyten	25,90
Eosinophile G.	39,31
Basophile G.	96,29
LUC	-

Die in eigener Untersuchung ermittelten Präzisionen bei der automatischen Zelldifferenzierung mit dem H*1 unterstreichen die Ergebnisse früherer Studien. In der folgenden Tabelle sind diese Ergebnisse aus Gründen der besseren Übersicht tabellarisch aufgeführt.

Tabelle 29: Vergleich der Variationskoeffizienten CV der relativen Zahlen des Differenzialblutbildes bei der Katze, H*1

	Eigene Untersuchungen	SUCHFORT (1998)	LIEDL und HIRSCHBERGER (1997)
	CV %		
Neutrophile G.	2,28	2,4	2,3
Lymphozyten	5,5	6,9	9,6
Monozyten	23,5	18,7	18,1
Eosinophile G.	12,3	15,6	10,6
Basophile G.	35,11	79,8	-
LUC	6,97	-	-

Wie aus Tabelle 29 ersichtlich ist, sind die Präzisionen der eigenen Untersuchungen, sowie der von SUCHFORT (1998) und LIEDL und HIRSCHBERGER (1997) für die

automatische Zelldifferenzierung des H*1 besser als die von BUTTARELLO et al. (1992) vorgelegten Präzisionen für Humanblut. Berücksichtigt man die im Vergleich zum visuellen Differenzialblutbild große Anzahl an untersuchten Zellen, sind die Variationskoeffizienten für die Eosinophilen Granulozyten und Monozyten nur mäßig bis schlecht.

In der folgenden Tabelle 30 sind die Präzisionen des ADVIA™ 120 über verschiedene Serien und innerhalb der Serie den Präzisionen von MORITZ (2000) gegenübergestellt.

Tabelle 30: Vergleich der Variationskoeffizienten CV der relativen Zahlen des Differenzialblutbildes bei der Katze, ADVIA™ 120

	Eigene Untersuchungen		MORITZ (2000)
	Über verschiedene Serien hinweg	Innerhalb der Serie	
	CV %		
Neutrophile G.	7,03	12,1	3,6
Lymphozyten	12,80	2,6	7,6
Monozyten	25,43	7,7	23,4
Eosinophile G.	79,08	23,2	26,0
Basophile G.	31,16	33,8	32,3
LUC	29,23	41,5	24,5

Bei Beurteilung der Präzisionen fällt auf, dass die Ergebnisse der Messwiederholungen über verschiedene Serien hinweg schlechter sind als innerhalb der Serie und von MORITZ (2000). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Proben zu einem Großteil von Tieren mit hämatologischen Veränderungen stammen. In die Untersuchungen von MORITZ (2000) werden aus dem gesamten Untersuchungsgut nur hämatologisch unauffällige Tiere einbezogen. Bei den Ergebnissen der Präzisionen innerhalb der Serie und denen von MORITZ (2000), fallen im Vergleich zum H*1 schlechtere Variationskoeffizienten für die Eosinophilendifferenzierung auf. Erfreulich ist auf den ersten Blick der niedrige Variationskoeffizient für die Monozyten

bei der Präzision innerhalb der Serie. Allerdings zeigen die Messergebnisse von MORITZ (2000) wie auch schon beim H*1, nur eine schlechte Wiederholbarkeit. Der relativ hohe Variationskoeffizient für die Neutrophilen Granulozyten bei der Präzision innerhalb der Serie ist als Ausreißer zu werten (MORITZ, 2000).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der ADVIATM 120 in der Softwareversion V.1.04-MS für die Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten eine gute bis akzeptable, und für die Monozyten- und Eosinophilendifferenzierung nur eine mäßige bis schlechte Präzision aufweist.

7.1.3 Präzision der Retikulozytenzählung

Die Präzision der Retikulozytenzählung erfährt mit der durchflusszytometrischen Messung eine deutliche Verbesserung (BUTTARELLO et al., 2001). Während Perkins (1995) für die manuelle Retikulozytenzählung nur einen Variationskoeffizienten von > 25 % erreicht, liegt der CV bei der automatischen Zählung bei 2,8 % (PERKINS und GRINDEM, 1995). Auch D'ONOFRIO et al. (1997) bestätigen der automatischen Messung eine zehnmal größere Präzision als der mikroskopischen Methode (D'ONOFRIO et al., 1997). In einer Präzisionsstudie von BRUGNARA et al. (1997) kann bei Humanblut am ADVIATM 120 ein CV von 7,77 % für die Retikulozytenzählung erreicht werden. In derselben Studie werden für die Retikulozytenindizes MCVr (0,58 %), CHCMr (0,53 %) exzellente, und für RDWr (8,32 %) und HDWr (6,81 %) gute Variationskoeffizienten erzielt (BRUGNARA et al., 1997).

In der eigenen Untersuchung wird nach Softwareadaptation bei der Präzision über verschiedene Serien hinweg eine deutliche Verbesserung des CV von 23,35 % auf 12,49 % in Softwareversion 4 erlangt. Bei der Präzision innerhalb der Serie liegt der Variationskoeffizient für die absolute Retikulozytenzählung bei 9 %. Im Vergleich zu der Literatur sind dies gute bis akzeptable Ergebnisse.

Bei den Retikulozytenindizes der Katze kann MORITZ (2000) mit dem ADVIATM 120 für die Parameter MCVr (1,2 %), CHCMr (1,9 %), RDWr (7,4 %) und HDWr (9,2 %) vergleichbare gute Variationskoeffizienten wie BRUGNARA et al. (1997) vorweisen (MORITZ, 2000).

7.2 Linearität und Carry over des ADVIA™ 120

Die entsprechend des Protokolls des ICSH durchgeführte Untersuchung der Linearität liefert exzellente Ergebnisse für die Parameter RBC und HB. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 1$ kann über den Messbereich eine stabile Bestimmung präsentiert werden.

Beim Carry over kann für die Parameter RBC und HB eine Beeinflussung der Folgemessungen durch evtl. im Leitungssystem des Gerätes verbliebenes Probenmaterial der vorherigen Messungen ausgeschlossen werden. Das Carry over für den Parameter RBC liegt mit einem Wert von 0,04 % deutlich unter dem geforderten Grenzbereich von 0,2 %, für den HB war keine Verschleppung nachweisbar. Zum Vergleich erhält Klingler (1997) bei der Untersuchung des Carry overs von Humanblut mit dem ADVIA™ 120 für den HB eine Verschleppung von 0,4 %, für den RBC von 0,1 % (KLINGLER, 1997).

Im Rahmen dieser Studie ist die Untersuchung der Parameter WBC und PLT aufgrund der erforderlichen großen Blutmenge nicht möglich. Bei Humanblut ermittelt Klingler (1997) mit dem ADVIA™ 120 für die Parameter WBC-P ein Carry over von 0,3 %, für WBC-B von 0,15 % und für die Blutplättchen von 0,15 % ermitteln (KLINGLER, 1997). Auch STANWORTH et al. (1999) belegt mit dem ADVIA™ 120 für die Thrombozyten eine Verschleppung $< 0,2$ % (STANWORTH et al., 1999).

7.3 Methodenvergleich

Der Methodenvergleich dient der Beurteilung der Richtigkeit bzw. von systematischen analytischen Fehlern einer neuen Methode im Vergleich zu bereits etablierten Messmethoden (WESTGARD et al., 1974). Um die Richtigkeit des ADVIA™ 120 für die Blutzellzählung und -differenzierung bei der Katze zu überprüfen, werden die Messergebnisse des ADVIA™ 120 mit denen von H*1, F800, der Hämatokritzentrifuge und der mikroskopischen Differenzierung PAN-, POX-, ANAE- und supravitalgefärbter Blutaussstriche verglichen.

7.3.1 Blutzellzählung

Für die Parameter RBC, HB, HCT, MCV, MCH und RDW werden zwischen dem ADVIA™ 120 und der Referenzmethode H*1 exzellente Korrelationen von $r > 0,975$ ermittelt. Erfreulich ist die hervorragende Korrelation der Ergebnisse der Leukozytenzählung ($r = 0,995$). Hierbei werden zwei Geräte mit unterschiedlicher Messtechnik verglichen. Beim H*1 wird der Leukozytenwert aus dem Peroxidasekanal reportiert, beim ADVIA™ 120 neuerdings aus dem Basophilenkanal. Auch die Korrelation ADVIA™ 120/ F800 stellt sich mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,931$ erstaunlich gut dar, angesichts der bekannten Problematik der Beeinflussung der Leukozytenzählung durch Thrombozytenagglutinate, große Thrombozyten und Erythrozytenfragmenten bei Widerstandsmessgeräten (TVEDTEN, 1993a; TVEDTEN und WILKINS, 1988). So kann SUCHFORT (1998) eine deutliche Verbesserung der ursprünglichen Gesamtkorrelation ($r = 0,833$) für die Leukozytenzählung H*1/ F800 durch eine separate Korrelationsanalyse agglomerierter ($r = 0,55$) und nicht agglomerierter Proben ($r = 0,97$) erreichen. Für die vorher mäßige Korrelation sind die Thrombozytenagglutinate verantwortlich (SUCHFORT, 1998). Auch DAWSON et al. (2000) können in Übereinstimmung mit SUCHFORT (1997) bei der Evaluation eines Widerstandsmessgerätes im Vergleich zum H*1 nur eine Korrelation von $r = 0,863$ erreichen (DAWSON et al., 2000). DEHWURST et al. (2003) erzielen bei der Evaluation eines neuen Widerstandsmessgerätes (VetScan HMT, Abaxis, USA) eine Korrelation von $r = 0,81$. Als Referenzgerät dient das Widerstandmessgerät Cell-Dyn 3700 der Firma Abbott, USA (DEHWURST et al., 2003). Die Leukozytenzählung des ADVIA™ 120 wird durch Thrombozytenagglutinate nicht beeinflusst. Aus diesen Gründen ist für die Leukozytenzählung das Ergebnis eines als Referenzmethode eingesetzten Widerstandsmessgerätes daher nur unter Vorbehalt zu beurteilen, auch wenn in eigener Untersuchung eine gute Korrelation erreicht wird. Für die Korrelation von RBC, HB, HCT, MCV und MCH können beim Vergleich von ADVIA™ 120/ F800 mit einem Korrelationskoeffizienten von $r > 0,940$ ebenfalls sehr gute Resultate erzielt werden.

Die eigenen Ergebnisse werden in folgender Tabelle den Resultaten aus der Literatur gegenübergestellt.

Tabelle 31: Vergleich der Korrelationskoeffizienten für die Parameter WBC, RBC, HB, HCT, MCV und MCH von verschiedenen Studien bei der Tierart Katze

Autoren	Prinzip*	Korrelationskoeffizient (r)					
		WBC	RBC	HB	HCT	MCV	MCH
Eigene Untersuchungen	1	0,995	0,997	0,994	0,992	0,975	0,978
SUCHFORT (1998)	2	0,833	0,977	0,987	0,952	0,843	0,903
DAWSON et al. (2000)	2	0,863	0,985	0,986	-	0,955	-
DEHWURST et al. (2003)	4	0,81	0,99	0,98	0,97	0,90	0,90
LIEDL und HIRSCHBERGER (1997)	3	0,969	0,931	0,974	0,979	-	-
MISCHKE et al. (1995)	5	0,85	0,99	0,99	-	-	-
TVEDTEN und WILKINS (1988)	4	0,62	0,97	0,99	0,99	0,99	-
SPÄTH und WEBER (1992)	5	0,968	0,972	0,921	0,900	-	-
HOFMANN-LEHMANN et al. (1998)	6	0,93	-	0,97	0,98	-	-
NEUERER und HIRSCHBERGER (1999)	4	0,993	0,996	0,996	0,992	-	-

*Legende Messprinzipien:

1= optoelektronisch/ optoelektronisch, 2= optoelektronisch/ konduktometrisch,
 3= optoelektronisch/ manuell, 4= konduktometrisch/ konduktometrisch,
 5= konduktometrisch/ manuell, 6= QBC/ manuell

Bei der Beurteilung muss beachtet werden, dass bei den aufgeführten Arbeiten sowohl optoelektronische als auch konduktometrische und manuelle Messmethoden zum Einsatz kommen. Wie man der Tabelle entnehmen kann, sind die Korrelationskoeffizienten den Angaben der Literatur vergleichbar und in den meisten Fällen sogar besser.

Eine ausgezeichnete Übereinstimmung mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$ wird für die Messung des Hämatokritwertes mit dem ADVIATM 120 im Vergleich zur Mikrohämatokritzentrifuge erlangt.

Die Auswertung der Korrelationen der Parameter der Thrombozytenzählung wird aufgrund der Bedeutsamkeit bei der Katze im Folgenden separat abgehandelt. Die Diagnose einer echten Thrombozytopenie setzt eine akkurate Thrombozytenanalyse voraus. Aufgrund der bei Katzen häufig auftretenden Thrombozytenagglutinate gibt es keinen Goldstandard als Referenzmethode für die Thrombozytenzählung. Unabhängig von der Messtechnik ist eine akkurate Thrombozytenzählung beim Vorliegen von Thrombozytenaggregationen nicht möglich (TVEDTEN und KORCAL, 2001; ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998). Weder mit Automaten, noch mit manuellen Verfahren (Zählkammer) ist die korrekte Bestimmung der Thrombozytenzahl erreichbar (SUCHFORT, 1998). Im Rahmen dieser Untersuchungen werden die Thrombozyten mit drei verschiedenen Methoden, dem Widerstandsmessprinzip (F800), der eindimensionalen Thrombozytenanalytik im Laserlicht (H*1) und der neuartigen zweidimensionalen Thrombozytenanalytik (ADVIATM 120) bestimmt. Die Ergebnisse für die Parameter PLT und MPV der eigenen Untersuchungen sind denen der Literatur in nachfolgender Tabelle gegenübergestellt. Aus der Spalte „Prinzip“ geht hervor, welche Messprinzipien in der jeweiligen Studie miteinander korreliert werden.

Tabelle 32: Vergleich der Korrelationskoeffizienten für die Parameter PLT, MPV von verschiedenen Studien bei der Tierart Katze

Autoren	Prinzip*	Korrelationskoeffizient (r)	
		PLT	MPV
Eigene Untersuchungen	1	0,871	0,106
DORFMANN et al. (1997), Humanblut	1	0,904	-
STANWORTH et al. (1999); Humanblut	2	0,96	-
MORITZ und HOFFMANN (1997), SUCHFORT (1998)	2	0,453	0,196
DAWSON et al. (2000)	2	0,258	-
MORITZ und HOFFMANN (1997), SUCHFORT (1998)	3	0,466	-
TASKER et al. (2001)	3	0,776	-
LIEDL und HIRSCHBERGER (1997)	3	0,539	-
DEHWURST et al. (2003)	4	0,65	-
NEUERER und HIRSCHBERGER (1999)	4	0,86	-
WEISER und KOCIBA (1984)	5	0,93	-
HIRSCHBERGER und LIEDL (1997)	5	0,454	-
MISCHKE et al. (1995)	5	0,61	-
HOFMANN- LEHMANN et al. (1998)	6	0,88	-

*Legende Messprinzipien:

1= optoelektronisch/ optoelektronisch, 2= optoelektronisch/ konduktometrisch,

3= optoelektronisch/ manuell, 4= konduktometrisch/ konduktometrisch,

5= konduktometrisch/ manuell, 6= QBC/ manuell

Wie aus der Tabelle 32 hervorgeht, stellt sich die Korrelation von ADVIA™ 120/ H*1 in Softwareversion 4 mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,871$ im Vergleich zu den anderen Untersuchungen als gut dar.

Die Studien, in denen optoelektronische mit konduktometrischen Messmethoden verglichen werden, weisen deutlich schlechtere oder gar keine Korrelationen auf. Ursache liegt hier in dem aus der Literatur bekannten Problem der Messung feline Blutproben mit einem Widerstandsmessgerät.

Zum einen ist beim Widerstandsmessprinzip durch den geringen Größenunterschied zwischen den kleinen Erythrozyten (39 – 50 fl) und den großen Thrombozyten (11 - 18 fl) eine korrekte Trennung von Erythrozyten und Thrombozyten durch überlappende Volumenverteilungskurven häufig nicht oder nur annähernd möglich (HART und NOLTE, 1991; LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; MISCHKE et al., 1995; PFEIL und GENSCHOW, 1987; WEISER, 1983). Das hat zur Folge, dass weder die Angabe der Thrombozytenzahl, noch die des Mittleren Plättchenvolumens exakt ist (ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998).

Zum anderen führt das häufige Auftreten von Thrombozytenagglutinaten zu Pseudothrombozytopenien (HART und NOLTE, 1991; MISCHKE et al., 1995; PFEIL und GENSCHOW, 1987; TVEDTEN, 1993a). Die in diesem Zusammenhang verhältnismäßig gute Korrelation ($r = 0,860$) von NEUERER und HIRSCHBERGER (1999) beim Vergleich zweier Widerstandsmessgeräte erklärt sich durch das gleiche Messprinzip beider Geräte, die somit denselben Messfehler begehen. Dadurch kann trotz fehlerhafter Messung die Korrelation eine gute Übereinstimmung aufweisen (NEUERER und HIRSCHBERGER, 1999).

Die auffällig gute Korrelation ($r = 0,93$) eines Widerstandsmessgerätes und der mikroskopischen Thrombozytenzählung von WEISER und KOCIBA (1984) ist auf die Technik der Blutentnahme (Zweispritzentechnik) und damit einer erheblichen Reduktion von Agglutinaten zurückzuführen (WEISER und KOCIBA, 1984).

Die neuartige zweidimensionale Thrombozytenanalyse des ADVIA™ 120 erlaubt neben der schon beim H*1 bekannten graphischen Darstellung der Agglutinate im Leukogramm (MORITZ, 2000; SUCHFORT, 1998) auch deren zahlenmäßige Angabe. Eine ganz wesentliche Verbesserung ist allerdings eine akkuratere Thrombozytenanalyse von Proben, die interferierende Partikel (mikrozytäre Erythrozyten, Fragmentozyten, Erythrozytenmembranen, Zelltrümmer) enthalten.

Durch simultane Messung der Thrombozyten im Doppelwinkellaserstreulicht werden interferierende Teilchen aufgrund ihrer Größe und Dichte separiert von den Thrombozyten gemessen und dem Untersucher angezeigt (DORFMANN et al., 1997; FISCHER et al., 1997; KUNICKA et al., 2000; STANWORTH et al., 1999). So wird von den verschiedenen Zelltypen ein exklusives Dichtesignal erzeugt, so dass es zu keiner Überlappung von Thrombozyten und Erythrozyten im zweidimensionalen Scattergramm kommt (ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998).

ZELMANOVIC et al. (1998) beweist in einer sehr interessanten Studie, dass mit Hilfe der zweidimensionalen Thrombozytenanalytik die Thrombozyten unbeeinflusst von Erythrozyten gemessen werden. Hierzu wird Vollblut und plättchenreiches Plasma von 6 Katzen zum einen mit dem ADVIATM 120 und zum anderen mit dem Coulter STKS Hämatologiegerät (konduktometrisches Messprinzip) gemessen. Arbeitshypothese ist, dass Interferenzen zwischen Thrombozyten und Erythrozyten einen Einfluss auf das reportierte Mittlere Plättchenvolumen (MPV) und in Folge auch auf die Thrombozytenverteilungskurve haben. Diese stellt sich für die Thrombozyten im Normalfall rechtsschief (logarithmisch normal verteilt) dar, die Erythrozytenverteilungskurve ist normalverteilt. Kommt es nun zu einer Überlappung von Thrombozyten- und Erythrozytensignal, würden Verteilungskurven entstehen, die weder rechtsschief noch normalverteilt wären. Wie zu erwarten, weisen beide Geräte beim dem PRP (plättchenreiches Plasma, ohne interferierende Erythrozyten) rechtsschiefe Kurven auf. Bei der Untersuchung des Vollbluts allerdings zeigen beim Coulter nur 2 der 6 Proben logarithmisch normalverteilte Thrombozytenverteilungskurven, währenddessen mit der zweidimensionalen Analytik des ADVIATM 120 alle Proben rechtsschiefe Kurven aufweisen. ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998) folgern daraus, dass die neue Messmethode bei der Bestimmung der Parameter MPV und PLT unbeeinflusst von Erythrozyten ist (ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998).

Die neue Messmethodik des ADVIATM 120 zählt die Thrombozyten nicht nur unbeeinflusst von intakten Erythrozyten, sondern auch von Erythrozytenfragmenten und -membranen. Das folgende Beispiel einer Katze (Ktz. Nr. 134) mit hämolytischer Anämie und mikroskopisch im Blutaussstrich sichtbaren Erythrozytenmembranen zeigt dies eindrücklich. Im Vergleich dazu der Report von F800 und H*1.

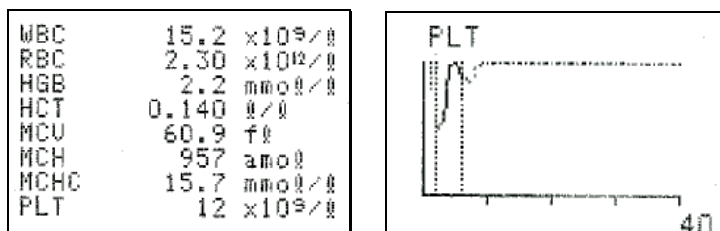


Abbildung 43: Datenreport CBC und Verteilungskurve von Katze Nr. 134, F800

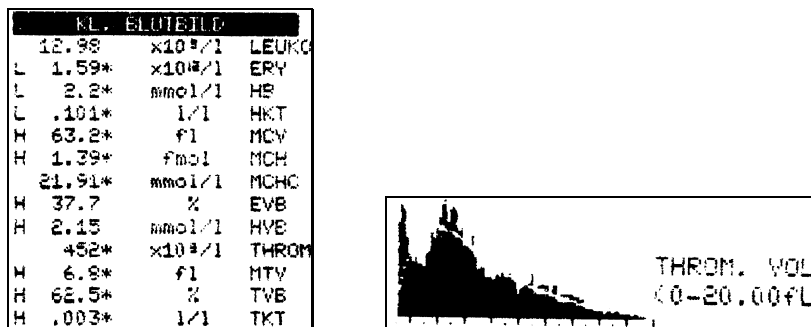


Abbildung 44: Datenreport CBC und Thrombozytenverteilungskurve von Katze Nr. 134, H*1

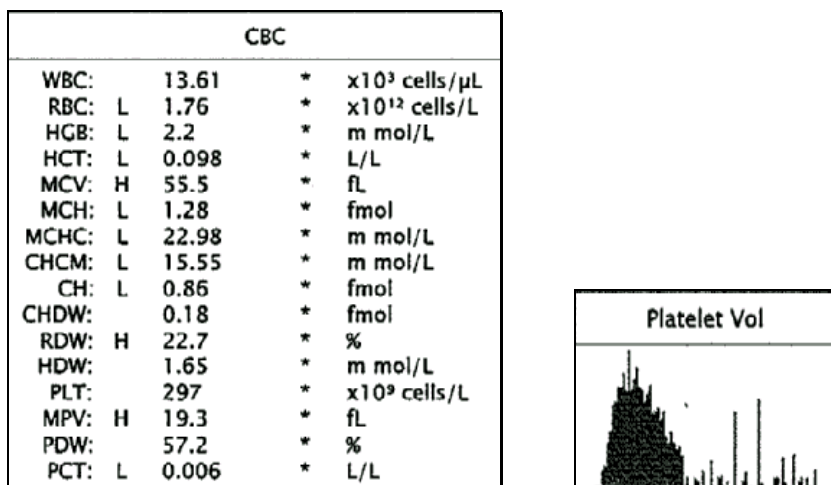


Abbildung 45: Datenreport CBC und Thrombozytenverteilungskurve von Katze Nr. 134, ADVIA™ 120

Während der F800 nur 12×10^9 Thrombozyten l^{-1} aufgrund überlappender Thrombozyten- und Erythrozytenverteilungskurve ausgibt, weist der H*1 452×10^9 Thrombozyten l^{-1} aus. Bei Betrachtung der Thrombozytenverteilungskurve allerdings fällt auf der linken Seite ein Peak auf, der visuell einen Hinweis auf Erythrozytendebriis liefert. Diese werden beim H*1 von der Thrombozytenzählung nicht ausgeschlossen. Beim ADVIA™ 120 hingegen fehlt bei der Thrombozyten-

verteilungskurve dieser Peak. Die folgende Abbildung zeigt das zugehörige Thrombogramm.

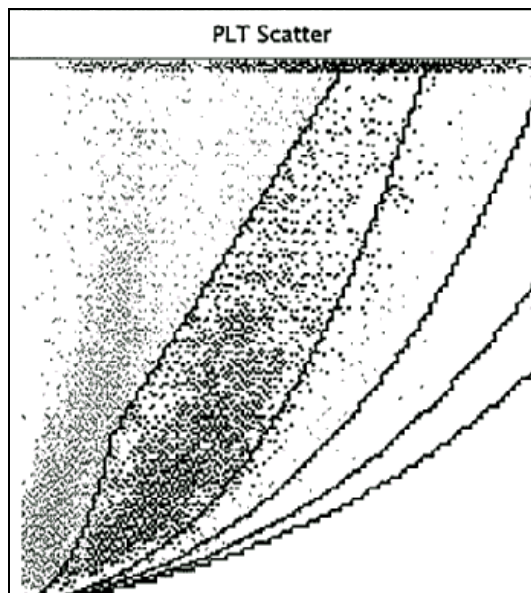


Abbildung 46: Thrombogramm von Katze Nr. 134, ADVIA™ 120

X-Achse= Hochwinkelsignal

Y-Achse= Niedrigwinkelsignal

Im Thrombogramm fällt links des Thrombozytenmessbereichs eine Punktwolke mit einem Brechungsindex $< 1,35$ auf. Diese Punktwolke deutet auf die Anwesenheit von Erythrozytenmembranen (Ghosts) hin, die mit Hilfe der zweidimensionalen Messmethodik separiert von den Thrombozyten erfasst werden. Das spiegelt sich auch in einer deutlich niedrigeren Thrombozytenzählung des ADVIA™ 120 wider. Nur 297×10^9 Thrombozyten l^{-1} werden beim ADVIA™ 120 reportiert.

Wie aus dem Thrombogramm ersichtlich ist, fallen die Erythrozytenmembranen durch ihren charakteristischen Brechungsindex mit Hilfe der zweidimensionalen Thrombozytenanalytik aus dem Thrombozytenmessbereich und ermöglichen somit eine von interferierenden Teilchen unbeeinflusste Thrombozytenzählung.

Nicht nur der Ausschluss interferierender Teilchen, sondern auch der Einschluss von großen Thrombozyten bei der Thrombozytenzählung, die bei der eindimensionalen Methode mittels mathematischem Algorithmus von der Thrombozytenanalytik ausgeschlossen werden, zeichnet die neue Messmethode aus (KUNICKA et al., 2000; STANWORTH et al., 1999).

Hierin ist die Ursache für die fehlende Korrelation ($r = 0,106$) des Mittleren Plättchenvolumens beim Vergleich ADVIATM 120/ H*1 zu erklären. Der ADVIATM 120 weist im Vergleich zum H*1 ein wesentlich größeres Mittleres Plättchenvolumen aus. So kann MORITZ (2000) für den ADVIATM 120 einen Referenzbereich für das Thrombozytenvolumen von 10,21 - 25,77 fl feststellen, der deutlich über den Angaben von TVEDTEN (1999) für den H*1 mit 4,10 - 8,30 fl liegt (MORITZ, 2000; TVEDTEN, 1999).

Zu ähnlichen Resultaten kommen DORFMANN et al. (1997) bei der Untersuchung von Humanblut. Für den Parameter MPV zeichnen sich im Vergleich zu den Referenzmethoden H*3 (Mittelwert 6,4 fl, Spannweite 3,4 - 9,2 fl) und ADVIA 120 (Mittelwert 5,9 fl, Spannweite 3,3 - 8,7 fl) ein erheblich höheres Mittleres Plättchenvolumen (Mittelwert 12 fl, Spannweite 6,7 - 24,2 fl) für den ADVIATM 120 ab (DORFMANN et al., 1997).

STANWORTH et al. (1999) vermuten in diesem Zusammenhang, dass bei der eindimensionalen Thrombozytenanalytik sehr große Thrombozyten aus dem Messbereich herausfallen. Bei der zweidimensionalen Thrombozytenanalytik des ADVIATM 120 werden sie aber erfasst und führen so zu einer deutlichen Steigerung der Spannweite und des Mittleren Plättchenvolumens (KUNICKA et al., 2000; STANWORTH et al., 1999).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass mit dem ADVIATM 120 hervorragende Korrelationen für die Parameter der Blutzellzählung im Vergleich zu bereits etablierten Untersuchungsmethoden erzielt werden können. Die mäßigen Korrelationen für die Thrombozytenzählung sind in Ermangelung eines geeigneten Referenzgerätes nur bedingt zu bewerten. Die neue Messmethode liefert von interferierenden Teilchen unbeeinflusste Resultate und führt zu einer Korrektur des Referenzbereichs für das Mittlere Thrombozytenvolumen. Thrombozytenagglutinate fallen aus dem Messbereich der Thrombozyten und werden daher nicht mitgezählt. Der Untersucher wird graphisch sowie numerisch auf die Anwesenheit von Agglutinaten hingewiesen.

7.3.2 2 D-Thrombozytenanalyse

Diese Untersuchung dient der Untersuchung des Einflusses des Aktivierungsgrades der Thrombozyten in Abhängigkeit vom Agglutinationsgrad.

Wenn Plättchen agglutinieren oder durch einen starken Agonisten stimuliert werden, führt dies zu einer Formveränderung, zum Schwellen und einer Degranulation der Thrombozyten. Die Degranulation führt zu einer veränderten Exprimierung von Oberflächenantigenen. So wird z.B. nur von aktivierten Thrombozyten das Oberflächenantigen P-Selectin (CD62P) präsentiert.

Durchflusszytometrisch kann dieses mit Hilfe eines spezifischen CD62P-Antikörpers detektiert werden (MACEY et al., 1999; MORITZ et al., 2003). Die Expression korreliert mit der Aktivierung der Thrombozyten (MACEY et al., 1999; MORITZ et al., 2003). So weisen MORITZ et al. (2003) in einer Untersuchung bei Hunden nach Aktivierung der Thrombozyten ex vivo mit PMA (phorbol myristate acetate) mit der FACSCAN-Analyse einen deutlichen Anstieg des Oberflächenantigens P-Selectin nach (MORITZ et al., 2003).

CHAPMAN et al. (1999) legen in einer humanen Studie dar, dass für den neuen Parameter MPC der zweidimensionalen Thrombozytenanalytik des ADVIA™ 120 ein enger Zusammenhang zu dem Aktivierungsgrad der Blutplättchen besteht. Hierzu werden parallel mit EDTA und Citrat antikoagulierte Blutproben vor und nach Stimulation mit humanem Thrombin mit der FACSCAN- Analyse und dem ADVIA™ 120 gemessen. Die aktivierten Thrombozyten in der FACSCAN- Analyse werden mit CD62P- Antikörpern markiert. Mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,99$ kann eindrucksvoll gezeigt werden, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) CD62P- positiver aktivierter Thrombozyten und der Mittleren Konzentration Innerer Bestandteile der Thrombozyten (MPC) existiert. Dosisabhängig kann eine Zunahme der CD62P- Expression und eine Abnahme von MPC nachgewiesen werden (CHAPMAN et al., 1999; MACEY et al., 1999).

MORITZ et al. (2005) stellen in einer Untersuchung von 20 kranken Hunden mit septikämischen (9 Hunde) und nichtseptikämischen (11 Hunde) entzündlichen Erkrankungen für die CD62P (P-Selectin)- positiven Thrombozyten und den

Parameter MPC eine Korrelation von $r = 0,62$ fest. Hierbei weisen 16 Hunde ein MPC unterhalb, aber nur 12 der Hunde ein P-Selectin oberhalb des Referenzbereiches auf. Alle Hunde mit einem erhöhten P-Selectin zeigen auch einen erniedrigten MPC. 4 Hunde allerdings zeigen trotz erniedrigtem MPC ein normales P-Selectin. Schlussfolgernd aus dieser Untersuchung stellt sich der Parameter MPC als die sensitivere Methode zur Detektion aktivierter Thrombozyten dar (MORITZ et al., 2005).

Der vom ADVIATM 120 reportierte Wert MPC wird aus dem Ergebnis des Hoschwinkelsignals, dem Refraktäindex, nach folgender Formel berechnet.

$$\text{MPC (g/ dl)} = ((\text{RI}^* - 1,333^{**}) / 0,0018^{***} \text{dl/ g})$$

*RI = gemessener Refraktäindex

**1,333 = Refraktäindex von Wasser

***0,0018/ g/ dl = durchschnittlicher Refraktäindex der Inhaltsstoffe (Proteine, Lipide, Carbohydrate)

Der Refraktäindex der Thrombozyten steht in einem linearen Verhältnis zur Konzentration der Inneren Bestandteile der Thrombozyten (MPC) und der Thrombozytendichte, die -wie oben dargestellt- ein Maß für die Aktivierung der Thrombozyten darstellen (MORITZ et al., 2003; MORITZ et al., 2005; ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998).

In der eigenen Untersuchung wird geprüft, inwieweit der Agglutinationsgrad der Blutproben mit dem Parameter MPC, also dem Aktivierungsgrad der Thrombozyten korreliert. Geht man bei agglutinierten Blutproben von vermehrt aktivierten, d.h. geschwollenen degranulierten Thrombozyten aus, wären Unterschiede bezüglich der Parameter MPV und MPC zu erwarten. Wie der Tabelle 26 zu entnehmen ist, werden für das Mittlere Plättchenvolumen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Mit einem MPV von $15,63 \pm 2,08$ fl sind die nichtagglutinierten Thrombozyten zwar im Vergleich zu den hochgradig agglutinierten mit einem MPV von $16,64 \pm 1,47$ fl etwas kleiner, die Unterschiede sind allerdings aufgrund der überlappenden Streubereiche nicht signifikant. In einer Studie weisen ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998) bei einer Untersuchung von 48 Katzen für die agglutinierten Proben ($n = 32$) ein MPV von $18,3 \pm 2,6$ fl und für die nicht agglutinierten Proben ($n = 16$) ein MPV von $14,2 \pm 1,3$ fl nach. Hier sind die Unterschiede hoch signifikant.

Für den Parameter MPC dagegen können in Übereinstimmung mit ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998) signifikante Unterschiede bezüglich des Agglutinationsgrades verzeichnet werden. Der MPC der agglutinierten Proben von $19,04 \pm 0,70 \text{ g dl}^{-1}$ - $21,45 \pm 1,36 \text{ g dl}^{-1}$ (ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998), $16,3 \pm 0,93 \text{ g dl}^{-1}$) ist signifikant niedriger als der MPC der nicht agglutinierten Proben mit $23,72 \pm 1,23 \text{ g dl}^{-1}$ (ZELMANOVIC und HETHERINGTON (1998), $20,8 \pm 0,41 \text{ g dl}^{-1}$). Zu beachten ist, dass zur Messung des MPC auch bei den aggregierten Blutproben nur die nicht aggregierten Thrombozyten herangezogen werden. Die Agglutinate, anhand derer die Einteilung hier erfolgt ist, fallen aus dem Messbereich der Thrombozyten heraus. Das bedeutet, dass auch die nicht aggregierten Thrombozyten der aggregierten Blutprobe degranulieren. Bei der mikroskopischen Untersuchung erscheinen diese blasser, was auch einen Hinweis auf den Verlust der Granula liefert (ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998).

Die folgenden Abbildungen sollen exemplarisch die Messergebnisse des ADVIATM 120 einer agglutinierten Blutprobe im Vergleich zu einer nicht agglutinierten Blutprobe vorstellen.

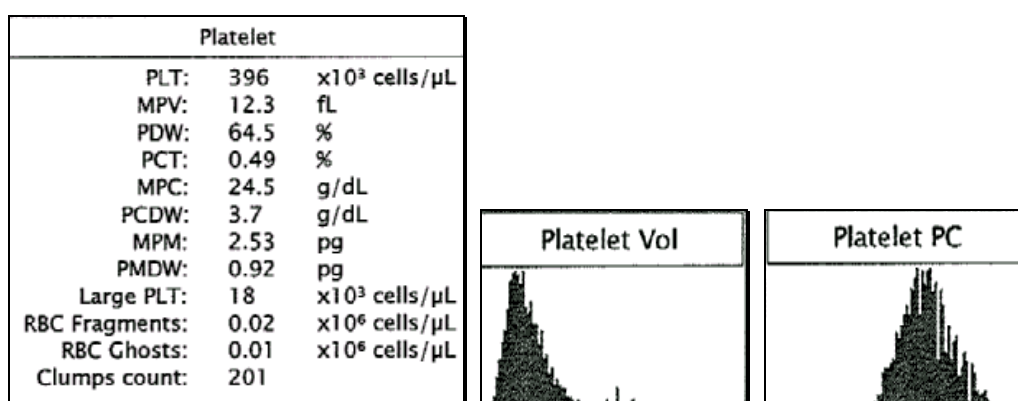


Abbildung 47: Datenreport Platelet und Volumenverteilungskurve der Parameter MPV (Platelet Vol) und MPC (Platelet PC) von einer Katze, ADVIATM 120
 X-Achse= MPV (mittl. Abb.), MPC (rechte Abb.)
 Y-Achse= Thrombozytenzahl

Wie dem Datenreport zu entnehmen ist, weist diese nicht agglutinierte Probe bei einer Gesamthrombozytenzahl von $396 \times 10^9 \text{ Zellen } \mu\text{l}^{-1}$ und einer normalschief verteilten Thrombozytenverteilungskurve ein Thrombozytenvolumen von 12,3 fL und einen MPC von $24,5 \text{ g dl}^{-1}$ auf. Die MPC- Volumenverteilungskurve entspricht der Gauß'schen Normalverteilung. Die Resultate einer agglutinierten Blutprobe dokumentieren folgende Abbildungen.

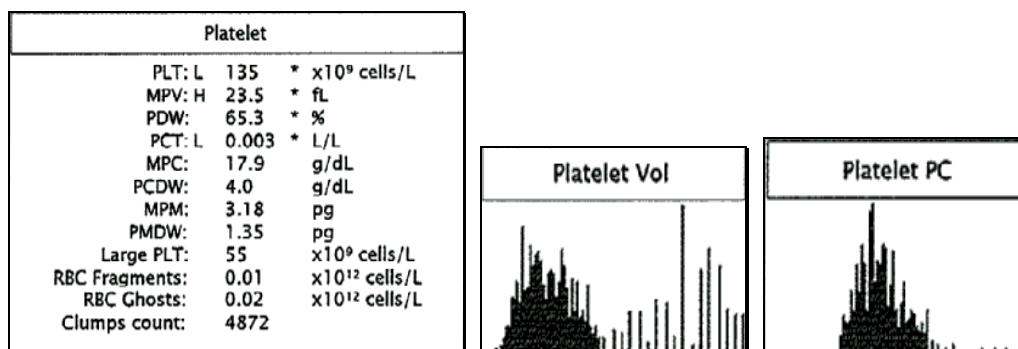


Abbildung 48: Datenreport Platelet und Volumenverteilungskurve der Parameter MPV (Platelet Vol) und MPC (Platelet PC) von einer Katze, ADVIATM 120
 X-Achse= MPV (mittl. Abb.), MPC (rechte Abb.)
 Y-Achse= Thrombozytenzahl

Bei 4872 gezählten Thrombozytenagglutinen (Clumps count) ist das Mittlere Thrombozytenvolumen mit 23,5 fL sehr groß. Die Konzentration der inneren Bestandteile der Thrombozyten (MPC) mit einem Wert von 17,9 g dL⁻¹ ist sehr niedrig. Dies deutet auf geschwollene, degranulierte (= aktivierte) Thrombozyten hin. Das wird auch in den veränderten Volumenverteilungskurven offensichtlich. Die Thrombozytenverteilungskurve ist nicht mehr „log-normal“, das Maximum ist aufgrund der großen Thrombozyten nach rechts verschoben. Gleichzeitig fällt bei der MPC-Verteilungskurve eine Verschiebung der Kurve nach links (vermehrt degranulierte Thrombozyten) und nunmehr eine rechtsschiefe Verteilung auf.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe des neuen Thrombozytenparameters MPC eine Aussage über den Aktivierungsgrad der Thrombozyten getroffen werden kann. Diese Aktivierung kann zum einen durch die Umstände der Blutabnahme (Ausschüttung von Aggregationsinduktoren), das Antikoagulant und die Lagerungsdauer (Kap. 4.5) verursacht werden. Zum anderen können eine entzündliche Grunderkrankung oder andere krankhafte Prozesse eine Aktivierung hervorrufen. Um die klinische Bedeutung einer Thrombozytenaktivierung allerdings korrekt beurteilen zu können, müssen die oben erläuterten Einflüsse möglichst ausgeschlossen werden. Die krankheitsbedingte Aktivierung der Thrombozyten wird in Zukunft noch ein interessantes Feld für weitere Untersuchungen liefern. In einer Untersuchung von MORITZ et al. (2005) stellt sich der Parameter MPC als nützlicher Marker zur Detektion aktivierter Thrombozyten bei inflammatorischen Erkrankungen beim Hund dar (MORITZ et al., 2005). Im Vergleich zu der doch zeit- (ca. 60 Minuten werden allein zur Probenpräparation benötigt) und kostenintensiven durchflusszytometrischen Detektion bestimmter exprimierter

Oberflächenantigene, ist die Bestimmung des Parameters MPC im Rahmen eines Routineblutbildes deutlich schneller und kostengünstiger mit dem ADVIA™ 120 möglich (MORITZ et al., 2005).

7.3.3 Blutzelldifferenzierung

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Blutzelldifferenzierung den Ergebnissen der Literatur gegenübergestellt. Beachtung finden nur die Korrelationsergebnisse der Softwareversion 4 des ADVIA™ 120.

Die Ergebnisse des Methodenvergleichs sind in der folgenden Tabelle den Ergebnissen der Literatur gegenübergestellt und werden anschließend diskutiert.

Tabelle 33: Vergleichende Darstellung der Ergebnisse des Methodenvergleichs für die Parameter der Blutzeldifferenzierung (Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, Eosinophile Granulozyten) unter Angabe des Korrelationskoeffizienten r

Autoren	Korrelationskoeffizient (r)			
	Neutrophile Granulozyten	Lymphozyten	Monozyten	Eosinophile Granulozyten
Eigene Untersuchungen (ADVIA™ 120/ H*1)	0,902	0,936	0,520	0,244
Eigene Untersuchungen (ADVIA™ 120/ PAN)	0,839	0,824	0,419	0,622
SUCHFORT (1998)	0,901	0,866	0,190	0,243
TVEDTEN und KORCAL (1996)	0,870	0,830	0,340	0,150
LIEDL und HIRSCHBERGER (1997)	0,720	0,773	0,417	0,091
BUTTARELLO et al. (1992), Humanblut	0,974	0,961	0,717	0,948

Für die Neutrophilen Granulozyten kann ein guter Korrelationskoeffizient mit dem H*1 von $r = 0,902$ und für die manuellen Differenzierungen von $r = 0,830 - 0,844$ erzielt werden. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit denen von SUCHFORT (1998). So ermittelt SUCHFORT (1998) einen Korrelationskoeffizienten zwischen H*1 und panoptischer Färbung von $r = 0,901$. Etwas schlechtere Korrelationen für die Neutrophilen Granulozyten werden von TVEDTEN und KORCAL (1996) und LIEDL und HIRSCHBERGER (1997) mit Korrelationskoeffizienten von $r = 0,870$ und $r = 0,720$ erreicht.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse für die Lymphozytendifferenzierung fällt in der eigenen Untersuchung eine sehr gute Korrelation von $r = 0,936$ (ADVIATM 120/ H*1) und eine zufriedenstellende Korrelation von $r = 0,824$ (ADVIATM 120/ PAN) auf. Diese Ergebnisse stehen auch in Übereinstimmung mit der Literatur (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN und KORCAL, 1996).

Wie aus Tabelle 33 hervorgeht, kann für die Monozytendifferenzierung ein mit der Literatur vergleichbares Ergebnis dokumentiert werden. Eine mäßige Korrelation kann sowohl beim Vergleich der zwei Automaten (ADVIATM 120/ H*1) als auch beim Vergleich von ADVIATM 120 und manueller Differenzierung beobachtet werden. Für die mäßige Korrelation von manueller Differenzierung (PAN) und ADVIATM 120-Messung von $r = 0,419$ kommen ursächlich mehrere Faktoren in Frage. Zum einen ist nicht von einer gleichmäßigen Verteilung der Monozyten (STIENE-MARTIN, 1980) auf dem Objektträgerpräparat auszugehen. Zum anderen werden im Vergleich zur automatisierten Differenzierung bei der manuellen Untersuchung bedeutend weniger Zellen analysiert (GOOSSENS et al., 1991b). Eine weitere Ursache liegt in der Vielgestaltigkeit der Monozyten (JAIN, 1993), die ihre Erkennung erschweren kann. Durch Einsatz der Spezialfärbung ANAE wird untersucht, ob eine bessere Übereinstimmung mit der automatischen Blutzelldifferenzierung erzielt werden kann. Allerdings zeichnet sich in der eigenen Untersuchung keine Verbesserung der Korrelation ab (ADVIATM 120/ PAN: $r = 0,419$; ADVIATM 120/ ANAE: $r = 0,394$). Diese Ergebnisse bestätigen die Untersuchungen von LIEDL et al. (1997), die durch die Spezialfärbung auch keine Steigerung der Korrelation verzeichnen können (H*1/ PAN: $r = 0,417$; H*1/ ANAE: $r = 0,391$). SUCHFORT (1998) allerdings steigert bei ANAE- gefärbten Blutausstrichen durch Erhöhung der Anzahl differenzierter Zellen von 100 auf 400 die Korrelation mit dem H*1 von $r = 0,668$ auf $r = 0,923$. Panoptisch gefärbte Blutausstriche korrelieren mit einem 100 Zellen-Differenzialblutbild nur mit $r = 0,190$ (SUCHFORT, 1998). Dass allerdings nicht nur die Anzahl untersuchter Zellen, die ungleichmäßige Verteilung der Zellen auf dem Objektträger und der untersucherabhängige Interpretationsfehler Einfluss auf die schlechte Korrelation ausüben, zeigt die auch nur mäßige Korrelation von ADVIATM 120 und H*1 mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,520$. Hier wird die Schwierigkeit der einheitlichen Zuordnung der Monozyten aufgrund der Größe und Peroxidaseaktivität im Perox-Scatter deutlich. Als Ursache kommt die enorme morphologische Variabilität der Monozyten in Frage (JAIN, 1993), aber auch der

statistische Fehler bei zahlenmäßig geringer vertretenen Zellarten (BUTTARELLO et al., 1992; TVEDTEN und WILKINS, 1988).

Ein großes Problem bei der Katze stellt die Eosinophilendifferenzierung dar. Wie schon in Kapitel 2.4.2 erläutert, sind die Eosinophilen Granulozyten große, peroxidasenegative Zellen, die aber aufgrund der Eigenabsorption ihrer Granula in den Messbereich der peroxidasepositiven Neutrophilen Granulozyten fallen. Dort befinden sie sich oberhalb der Neutrophilen- Population, bilden aber kein eigenes, klar abgrenzbares Cluster (TVEDTEN und KORCAL, 1996). Wie der Tabelle 33 zu entnehmen ist, werden übereinstimmend schlechte Korrelationen für die Eosinophilendifferenzierung des H*1 geliefert. Die Korrelationskoeffizienten bewegen sich zwischen $r = 0,091$ (LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997) und $r = 0,243$ (SUCHFORT, 1998). Dementsprechend schlecht fällt auch in der eigenen Untersuchung die Korrelation von ADVIA™ 120/ H*1 mit einem Korrelationskoeffizienten von $r = 0,244$ aus. Aus diesem Grund wird von verschiedenen Autoren konstatiert, dass der H*1 für die Blutzelldifferenzierung bei der Katze nicht geeignet ist (JAIN, 1993; LIEDL und HIRSCHBERGER, 1997; MORITZ et al., 1995; SUCHFORT, 1998; TVEDTEN, 1993a). Wie allerdings aus der Korrelation ADVIA™ 120 und der manuellen Differenzierung (PAN) mit einem Koeffizienten von $r = 0,622$ hervorgeht, kann durch die Softwareadaptation eine bessere Identifikation der Eosinophilen erreicht werden. Dieses mäßige Ergebnis ist aber noch kein zufriedenstellendes Resultat.

So wird im Anschluss an diese Studie eine neue Messtechnik für die Eosinophilen Granulozyten geprüft. Die Eosinophilen Granulozyten werden nicht mehr im Peroxidasekanal sondern im Retikulozytenkanal detektiert. Die Anfärbung der Zellen erfolgt, wie in Kap. 2.3.2.1.6 beschrieben, durch das Chromogen Oxazin 750, einem Neumethylenabkömmling. Die Eosinophilen Granulozyten können nun in diesem Kanal aufgrund ihrer Färbereigenschaften mit Hilfe des Niedrigwinkelsignals und der Absorption von den neutrophilen Granulozyten unterschieden werden. Da für die Retikulozytenzählung die Zellsuspension gegenüber der Leukozytenzählung in einer höheren Verdünnungsstufe vorliegt (Zählung von ca. 20.000 Erythrozyten/ Retikulozyten), werden bei der Katze für die Eosinophilenzählung im Retikulozytenkanal die Leukozyten dreimal gezählt und differenziert. Die aus der Dreifachmessung gemittelte Eosinophilenzahl wird dem Differenzialblutbild zugefügt und von der aus dem Peroxidasekanal reportierten Granulozytenzahl subtrahiert (MORITZ, 2000). Die im Anschluss an diese Studie anhand von 30 Katzen getestete

neue Messtechnik erbringt eine Steigerung der Korrelation auf $r > 0,800$ (eigene Untersuchung, ZELMANOVIC, persönliche Mitteilung, (MORITZ, 2000; MORITZ et al., 2004)).

In der geprüften Softwareversion sind aufgrund noch unvollständiger Systemeinstellung Hinweise auf Linksverschiebungen (LEFT SHIFT, auf Grundlage von Abweichungen des Lobularitätsindex LI und Mittleren Peroxidaseindex MPXI), Blasten und Nomoblasten noch unterdrückt, so dass hier keine Beurteilung vorgenommen werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass für die Differenzierung der Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten gute bis zufriedenstellende Korrelationen nachgewiesen werden können. In Übereinstimmung mit der Literatur kann nur eine mäßige Korrelation für die Monozytendifferenzierung erzielt werden. Durch Verbesserung der Software kann in der zu prüfenden Version eine Steigerung der Korrelation der Eosinophilendifferenzierung auf $r = 0,622$ erreicht werden. Die anhand von 30 Katzen überprüfte neue Messtechnik der Erfassung der Eosinophilen Granulozyten im Retikulozytenkanal führt weiterhin zu einer Steigerung der Korrelation auf $r > 0,800$ (eigene Untersuchung, ZELMANOVIC, persönliche Mitteilung, (MORITZ, 2000)).

7.3.4 Retikulozytenzählung

Die Richtigkeit der automatischen Retikulozytenzählung des ADVIA™ 120 wird mit Hilfe supravitalgefärbter Blutausstriche überprüft. Die Beurteilung dieser Korrelation muss unter der Einschränkung bewertet werden, dass hier der Vergleich von zwei sehr unterschiedlichen Methoden erfolgt. Bei der automatischen Retikulozytenzählung werden über 50.000 Zellen untersucht, während bei dem supravitalgefärbten Präparat nur 1.000 Zellen ausgezählt werden.

Beim Vergleich zweier Automaten empfiehlt das College of American Pathology für die automatische Retikulozytenzählung einen Korrelationskoeffizienten von mindestens $r = 0,95$ (SAVAGE et al., 1985). Für Humanblut können BRUGNARA et al. (1997) beim Vergleich ADVIA™ 120/ Sysmex R-3000 und ADVIA120/ FACScan einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,91$ ermitteln (BRUGNARA et al., 1997). Deutlich schlechtere Korrelationen verzeichnen BRUGNARA et al. (1994) bei der Korrelation der manuellen Zählung mit dem Technicon-H*3 ($r = 0,610$),

Durchflusszytometrie ($r = 0,755$) und dem Sysmex R-3000 ($r = 0,538$) (BRUGNARA et al., 1994).

In der eigenen Untersuchung kann zwischen der automatischen und manuellen Messmethode eine, auch im Vergleich zur Literatur, gute bis akzeptable Korrelation von 0,722 in der 1. Version, von 0,821 in der 2. und 3. Version und von 0,697 in der 4. Version gefunden werden. PERKINS und GRINDEM (1995) erhalten bei der durchflusszytometrischen Detektion von feline Retikulozyten im Vergleich zur manuellen Methode Korrelationen von nur $r = 0,56$. Allerdings können durch eine getrennte Untersuchung von punktierten und aggregierten Retikulozyten die Korrelationen für die aggregierten Retikulozyten auf $r = 0,72$ gesteigert werden (PERKINS und GRINDEM, 1995). REAGAN et al. (1992) erreichen bei der Katze für aggregierte Retikulozyten sogar einen Korrelationskoeffizienten von $r = 0,88$ bei der Korrelation der durchflusszytometrischen Methode mit der manuellen Zählung (REAGAN et al., 1992).

7.4 Antikoagulanzenvergleich

Die Ergebnisse des Antikoagulanzenvergleichs zeigen den doch zum Teil hochsignifikanten Einfluss des Gerinnungshemmers auf das Messergebnis. Wie aus Tabelle 20 ersichtlich ist, zeigen sich für die Parameter RBC, HB, MCH und RETI keine signifikanten Unterschiede, während für die Erythrozytenindizes ein Einfluss festzustellen ist. Ein Antikoagulanzen kann ein Schwellen oder auch ein Schrumpfen der Erythrozyten verursachen. GOOSSENS et al. (1991) und TVEDTEN (1981) machen bei dem Antikoagulanzen EDTA für diesen Einfluss vor allem inadäquat gefüllte Probenröhrchen verantwortlich. Hohe Konzentrationen an EDTA führen zum Schrumpfen von Erythrozyten und damit zu erniedrigten Werten von HCT und MCV (GOOSSENS et al., 1991a; TVEDTEN, 1981). Andererseits löst ein verlängerter Kontakt der Erythrozyten mit EDTA zum Beispiel während des Probenverkehrs ein Schwellen der Zellen aus (TVEDTEN, 1981).

Für die Leukozytenzählung kann wie bei MACEY et al. (2002) kein Einfluss des Antikoagulanzen beobachtet werden (MACEY et al., 2002).

Für eine zuverlässige Thrombozytenzählung spielt die Vermeidung von Thrombozytenaggregationen eine wichtige Rolle. Neben der Blutentnahme

(KILLINGSWORTH et al., 1985; SUCHFORT, 1998; WEISER und KOCIBA, 1984), hat das Antikoagulanz einen großen Einfluss auf die Entstehung von Thrombozytenagglutinen (LOMBARTS und DEKIEVIET, 1988; SAVAGE, 1984; THOMPSON et al., 1983). Das Antikoagulanz EDTA führt unmittelbar nach Kontakt zur isovolumetrischen Aufkuglung und dann zur Schwellung der Thrombozyten und kann Agglomerationen auslösen (MACEY et al., 2002). Citrat hat einen eher Thrombozyten stabilisierenden Effekt (THOMPSON et al., 1983). Allerdings zeigt eine Studie mit humanem Blut, dass es auch durch Citrat zu einer Schwellung der Thrombozyten kommt, diese erfolgt aber nicht spontan wie bei EDTA antikoagulierten Proben, sondern langsam kontinuierlich über 1 - 2 Stunden (MACEY et al., 2002). In der eigenen Untersuchung erfolgt die Messung innerhalb einer Stunde. Wie den Daten zu entnehmen ist, zeigen die mit EDTA antikoagulierten Proben im Vergleich zu den Heparin- und Citrat- Proben signifikante Unterschiede beim MPV, währenddessen zwischen Heparin und Citrat keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen sind.

Die in eigener Untersuchung ermittelten arithmetischen Mittelwerte und Spannweiten für den Parameter PLT ($363 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ für EDTA, $216 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ für Li- Heparin, $307 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$ für Na- Citrat) weisen in Übereinstimmung mit SUCHFORT (1998) nur geringfügige Unterschiede auf. Bei Betrachtung des nach der Bonferroni-Methode berechneten paarweisen Antikoagulantienvergleichs allerdings fallen hier vor allem beim Vergleich Heparin/ Citrat hochsignifikante Unterschiede beim PLT von bis zu 83 % auf. Auch SUCHFORT (1998) kann in einer Untersuchung zeigen, dass in Citrat antikoagulierten Blutproben deutlich weniger Thrombozytenagglomerate auftreten wie in Heparin oder EDTA (SUCHFORT, 1998).

In den folgenden Abbildungen wird der Einfluss des Antikoagulanz Li- Heparin im Vergleich zu Citrat dargestellt.

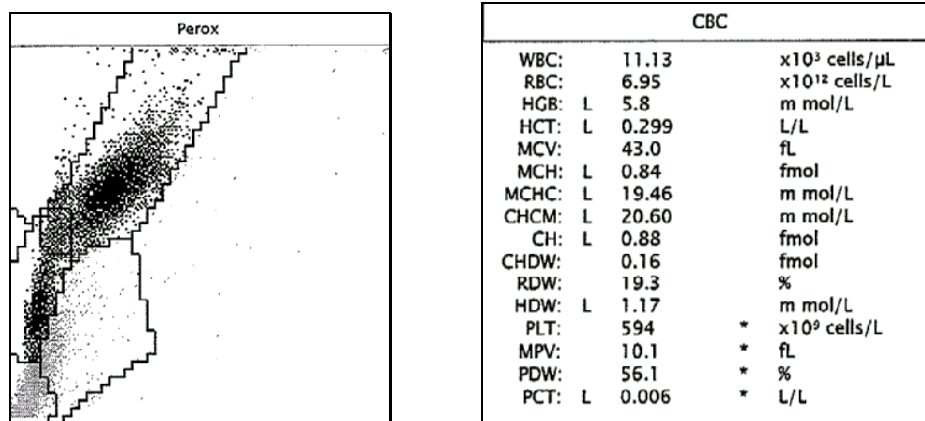


Abbildung 49: Leukogramm (Peroxis, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Datenreport (CBC) von Katze Nr.238, Citrat

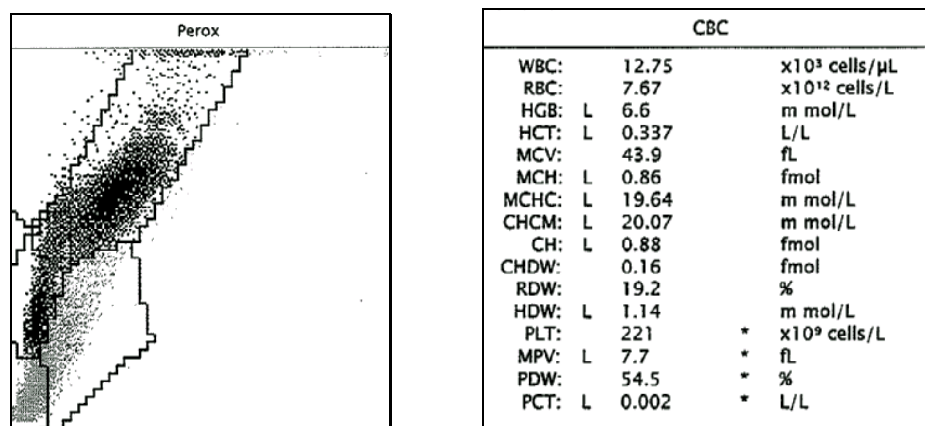


Abbildung 50: Leukogramm (Peroxis, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Datenreport (CBC) von Katze Nr. 238, Li- Heparin

Im Leukogramm der heparinisierten Blutprobe fällt im Vergleich zur Citrat- Probe eine im Winkel von ca. 60° aufsteigende Punktwolke auf. Diese Thrombozytenagglutinate fallen aus dem Thrombozytenmessbereich heraus. Wie aus dem Thrombogramm und dem Datenreport hervorgeht, werden deutlich (falsch)niedrige Thrombozytenwerte ($221 \times 10^9 \text{ l}^{-1}$) bei der heparinisierten Probe gemessen.

Auch auf der Suche nach einem idealen Antikoagulant, das die Thrombozyten zwar isovolometrisch aufkugelt aber ihren Aktivierungsstatus in vitro nicht verändert, untersuchen MACEY et al. (2002) mit EDTA, CTAD (Citrat, Theophyllin, Adenosin, Dipyridamol) und einer Kombination aus EDTA und CTAD antikoagulierte humane Blutproben. Die bei Raumtemperatur und Kühlschranktemperatur aufbewahrten Proben werden innerhalb von 3 Stunden am ADVIATM 120 analysiert. Zusätzlich wird

der Aktivierungsgrad der Thrombozyten durchflusszytometrisch bestimmt. Unabhängig vom Antikoagulant ändert sich die Thrombozytenzahl nur wenig, die Parameter MPV und MPC verändern sich reziprok. Bei Raumtemperatur erreichen sie zwischen 30 und 60 Minuten die größte Veränderung, während die im Kühlschrank gelagerten EDTA/CTAD-Proben die größte Veränderung 60 bis 180 Minuten später aufweisen. Die parallel durchgeführte Untersuchung des Aktivierungsgrades der Thrombozyten in der FACScan-Analyse mit Hilfe des Antikörpers CD62P (Marker für die Thrombozytenaktivierung) ergibt für die bei Raumtemperatur gelagerten Proben unabhängig vom Antikoagulant einen signifikanten Anstieg der Plättchenaktivierung, während die bei Kühlschrank gelagerten EDTA/CTAD-Proben nur eine minimale Aktivierung aufweisen. Die Autoren empfehlen deshalb zur Untersuchung des Aktivierungsgrades der Blutplättchen mit dem ADVIATM 120 die Verwendung des EDTA/CTAD-Antikoagulant und die Analyse 60 - 80 Minuten nach Probenentnahme. Unter diesen Umständen haben sich die Thrombozyten maximal aufgeklumpt ohne Aktivierung (MACEY et al., 2002). MACEY et al. (2002) führen zurzeit in Zusammenarbeit mit BD Bioscience und Bayer Corporation Studien zur Entwicklung solcher Probenröhrchen durch, die auch für die Thrombozytenanalytik bei der Katze von Interesse sind.

Schlussfolgernd aus den Untersuchungen und der Literatur (LOMBARTS und DEKIEVIET, 1988; SAVAGE, 1984; SUCHFORT, 1998; THOMPSON et al., 1983) ist für die Thrombozytenzählung Citratblut das am ehesten geeignete Material. Nachteil allerdings ist die relativ große Blutmenge, die innerhalb einer halben Stunde durchzuführende Messung und die notwendige rechnerische Korrektur der Zellzahlen aufgrund des Verdünnungseffektes des flüssigen Antikoagulant. Heparin ist aufgrund des negativen Einfluss auf die Thrombozytenzählung durch Agglutinatbildung nicht zu empfehlen.

7.5 Verlaufsuntersuchungen

Die Anschaffung von im Hinblick auf Probendurchsatz, Richtigkeit und Präzision immer leistungsfähigeren Hämatologiesystemen bleibt aufgrund der hohen Anschaffungskosten vor allem großen kommerziellen Untersuchungslabors und Kliniken vorbehalten. Das bedeutet für den einsendenden praktizierenden Tierarzt/ in, dass zwischen Blutentnahme und Messung signifikante Zeiten (mehrere Stunden bis Tage) liegen. Um die Auswirkungen in dieser präanalytischen Phase zu

überprüfen, wird bei 10 mit EDTA antikoagulierten Katzenblutproben der Einfluss von Lagerungsdauer und Lagerungstemperatur (4° C, 22° C) auf die Blutzellzählung und Blutzelldifferenzierung untersucht.

Wie aus den eigenen Untersuchungen hervorgeht, wird die Leukozytenzählung weder durch die Lagerungstemperatur noch die Lagerungsdauer signifikant beeinflusst. In Übereinstimmung mit SUCHFORT (1998) zeigen die Leukozytenzahlen maximale Abweichung von 2 %, wobei die bei Raumtemperatur gelagerten Proben noch geringere Abweichung im Vergleich zur gekühlten Probe aufweisen.

Auch die Erythrozytenzählung und die Hämoglobinmessung kann während des Messzeitraums in Übereinstimmung mit der Literatur (KLINGLER, 1997; SUCHFORT, 1998) mit hoher Stabilität (maximale Abweichung < 5%) gemessen werden.

Für die Parameter HCT, MCV, MCHC, RDW und HDW werden bezüglich der Lagerungsdauer hochsignifikante Unterschiede festgestellt. HCT und MCV weisen bis 24 h nach Blutabnahme einen Anstieg von ca. 5 % auf, wobei die Streuung um den Mittelwert bei den Raumtemperatur gelagerten Proben größer ausfällt als bei den kühl aufbewahrten Proben. 72 Stunden nach Abnahme sind bis zu 9 % Abweichung vom Ausgangswert zu beobachten, wobei die bei Raumtemperatur gelagerten Proben diese Abweichung rascher erreichen wie die bei 4° C gelagerten Proben. Diese Ergebnisse stimmen auch mit den Beobachtungen von SUCHFORT (1998) und GRENN et al. (1976) überein. SUCHFORT (1998) ermittelt nach 3 Tagen eine Abweichung von maximal 6 %, während GRENN et al. (1976) einen Abweichung beim HCT von 7,71 % ermitteln (GRENN et al., 1976; SUCHFORT, 1998). Klingler (1997) kann bei der Untersuchung von Humanproben einen Unterschied zwischen Raumtemperatur und Kühlschranktemperatur gelagerten Proben erkennen. So bleibt der MCV bei 4°C gelagerten Proben über 3 Tage annähernd stabil, nur die bei Zimmertemperatur gelagerten Proben zeigen einen Anstieg des MCV. Diese Beobachtung kann aufgrund eigener Untersuchungen und der Literatur, wo ein Anstieg von HCT und MCV unabhängig von der Lagerungstemperatur stattfindet, nicht bestätigt werden. Die Ursache für den Anstieg des MCV und damit auch des HCT liegt im Schwellen der Erythrozyten während der Lagerung. Wie aus der Literatur bekannt, löst ein verlängerter Kontakt der Erythrozyten mit dem Antikoagulanzen EDTA ein Schwellen der Zellen aus (GRENN et al., 1976; TVEDTEN,

1981). Mit dem Anstieg des MCV geht in Übereinstimmung mit der Literatur der Abfall des MCHC (errechnet) und CHCM (gemessen) einher, wie eindrücklich an der fast spiegelbildlich verlaufende Kurve (Abb. 26 - 28) zu erkennen ist.

Großen Einfluss hat die Lagerungsdauer auf die Parameter der Thrombozytenzählung. Bereits 3 Stunden nach Blutabnahme weisen die bei Raumtemperatur gelagerten Proben bei einer großen Streuung um den Mittelwert ca. 20 – 25 % erhöhte Thrombozytenzahlen auf, während die bei 4°C gelagerten Proben nach 3 Stunden ca. 12 % niedrigere Werte zeigen. Dies kann als vermehrtes Auftreten von Thrombozytenagglutinen bei den gekühlten Proben und möglicherweise Auflösung von Agglutinen nach Messzeitpunkt 0 der Blutentnahme bei den nicht gekühlten Proben interpretiert werden. Diese Beobachtungen stimmen nicht ganz mit denen von SUCHFORT (1998) überein. SUCHFORT (1998) ermittelt unabhängig von der Aufbewahrungstemperatur eine Abnahme der Plättchenzahl nach 2 Stunden um ca. 50 %. SUCHFORT (1998) sieht die Ursache der abnehmenden Thrombozytenzahlen in einer Thrombozytenagglomeration. Da die Thrombozyten nur bei den ungekühlten Proben nach einiger Zeit wieder ansteigen, vermutet SUCHFORT (1998) eine reversible Thrombozytenagglomeration bei den ungekühlten und eine irreversible Agglomeration bei den gekühlten Proben (SUCHFORT, 1998). Das Mittlere Plättchenvolumen MPV zeigt in den ersten 12 Stunden bei den ungekühlten Proben etwa um 4 % erniedrigte Werte. Währenddessen bei den gekühlten Proben ein Anstieg des MPV zu verzeichnen ist. Wie auch in der Literatur beschrieben, kommt es durch den Einfluss von EDTA zum Schwellen der Thrombozyten. EDTA als Chelatbildner führt über Kalziumentzug aus der Zelle zu einer Membrandestabilisierung und damit zum Schwellen der Zellen (BRUMMITT und BARKER, 2000). Nach 72 Stunden ist aufgrund der enormen Abweichung vom Ausgangswert und der Streuung um den Mittelwert keine Interpretation der Resultate möglich.

In der nachstehenden Abbildung ist graphisch anhand der Ergebnisse des ADVIA™ 120 der Einfluss der Lagerung auf die Erythrozyten- und Thrombozytenmessung verdeutlicht.

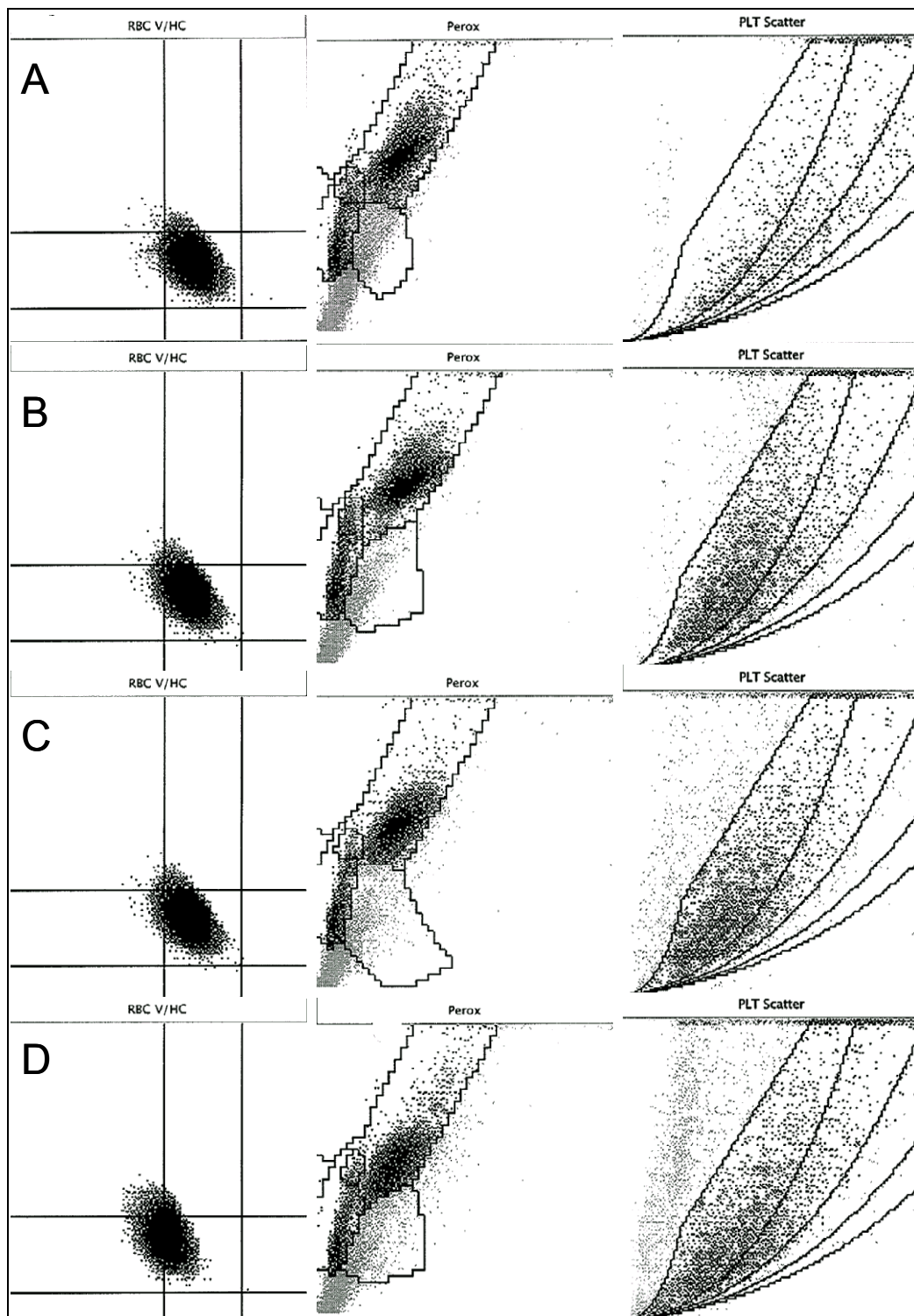


Abbildung 51: Erythrogramm (RBC V/ HC, X-Achse= Hämoglobingehalt, Y-Achse= Zellgröße), Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Datenreport (CBC), Thrombogramm (PLTScatter, X-Achse= Hochwinkelsignal, Y-Achse= Niedrigwinkelsignal) von Tier Nr.9, Raumtemperatur
 A = 0h, B = 3h, C = 48h, D = 72h, ADVIA™ 120

Zum Messzeitpunkt 0 sind im Leukogramm deutliche Thrombozytenagglutinate zu erkennen. Die gemessene Thrombozytenzahl beträgt 177×10^9 Zellen l^{-1} . Nach 3 Stunden steigen die Thrombozytenwerte auf 354×10^9 Zellen l^{-1} und bleiben auf diesem Niveau bis zum Ende des Messzeitraums. Die im ca. 60° Winkel aufsteigende Wolke im Peroxidasekanal ist schwächer geworden (reversible Thrombozytenagglomeration?). Die Erythrozytenpopulation schiebt sich durch Schwellen der Erythrozyten im Verlauf der Untersuchung vom normozytär-normochromen Bereich in den hypochrom-makrozytären Bereich. Dies geht einher mit dem Anstieg des Hämatokritwertes von 33,3 % auf 35,7 % nach 48 h und einem Abfall des MCHC von $19,03 \text{ mmol } l^{-1}$ auf $17,82 \text{ mmol } l^{-1}$. Nach 72 Stunden fällt ein leichter Abfall des Hämatokritwertes auf 34,4 % auf. Gleichzeitig signalisiert die interne Plausibilitätskontrolle des roten Blutbildes eine Differenz von errechnetem MCHC und gemessenem CHCM. Ursache hierfür kann eine z.B. eine Hämolyse sein. Dies könnte auch den leichten Abfall des Hämatokritwertes und die im Thrombogramm auftretende Wolke der RBC- Ghosts erklären. Die Thrombozytenmessung wird allerdings durch die auftretenden RBC- Ghosts nicht beeinflusst, da die Erythrozytenmembranen außerhalb des Messbereichs für Thrombozyten liegen.

In einer Untersuchung beim Pferd können CLARK et al. (2002) allerdings eine Pseudothrombozytose, verursacht durch RBC- Ghosts bei einer 48 h alten Blutprobe, durch die fehlerhafte Messung von Erythrozytenmembranen als Thrombozyten nachweisen (BRUMMITT und BARKER, 2000). In der folgenden Abbildung ist ein repräsentatives Thrombogramm einer über 48 h archivierten Pferdeblutprobe zu sehen. Hier fallen die Erythrozytenmembranen deutlich in den Thrombozytenmessbereich.

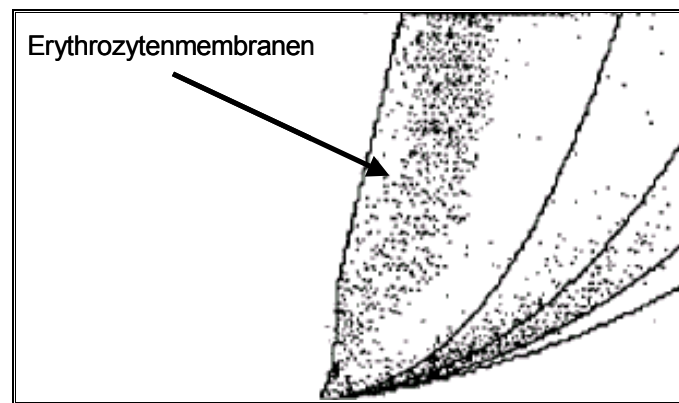


Abbildung 52: Thrombogramm (X-Achse= Hochwinkelsignal, Y-Achse= Niedrigwinkelsignal) einer 48 Stunden alten Pferdeblutprobe, ADVIA™ 120; (CLARK et al., 2002)

Diese fehlerhafte Zuordnung soll durch eine Softwarekorrektur behoben werden (TVEDTEN et al., 2002). Auch bei Hunden kann eine durch Erythrozytenmembranen (RBC-Ghosts) verursachte Pseudothrombozytose beobachtet werden (TVEDTEN et al., 2002)

Die Untersuchung des Einflusses der Lagerung auf die Messung des Differenzialblutbildes erfolgt vor dem Hintergrund der bekannten Problematik der Blutzelldifferenzierung bei der Katze. ROSIER et al. (1993) nehmen an, dass rein morphologische Bestimmungen durch präanalytische Einflüsse mit größerer Präzision und Richtigkeit durchgeführt werden können, als Messungen, die auf der Bestimmung der Enzymaktivitäten beruhen (ROSIER et al., 1993). Bei der Untersuchung des Einfluss der Lagerungsdauer auf die Blutzelldifferenzierung erweisen sich in der ungekühlten Probe die Lymphozyten über 72 Stunden, und die Neutrophilen Granulozyten über 24 Stunden als stabil. SUCHFORT (1998) kann diese Stabilität für die gekühlten Proben beobachten. In eigener Untersuchung zeigen die bei 4° C gelagerten Proben nach 3 Stunden einen deutlichen Abfall. Gleichzeitig verzeichnen die Eosinophilen Granulozyten bei den gekühlten Proben einen kurzfristigen Anstieg um 250 %. Hier besteht der Verdacht, dass Neutrophile Granulozyten aufgrund veränderter Peroxidaseaktivität und Größenveränderung bei Kühlung in den Messbereich der Eosinophilen Granulozyten fallen. Auf die Problematik der Blutzelldifferenzierung bei der Katze wird in Kap. 5.3.3 eingegangen.

Bei der Retikulozytenzählung zeigen sich schon wenige Stunden nach Blutentnahme deutliche Abweichungen vom Ausgangswert. Während die bei Raumtemperatur

gelagerten Proben nach 3 Stunden ca. 18 % erniedrigte Werte aufweisen, steigen die Werte der gekühlten Proben um ca. 25 % an. Für Humanblut verzeichnet BRUGNARA (1997) für gekühlte Proben eine gute Stabilität über den Messzeitraum, die ungekühlten Proben zeigen einen steten Abfall bis auf 50 % nach 72 Stunden. So befürwortet BRUGNARA (1997) eine sofortige Messung der Blutprobe, sofern sie nicht gekühlt gelagert wird. Als eine der Ursachen für die ungenügende Stabilität der Retikulozytenmessung führen BUTTARELLO et al. (2001) die fortschreitende Reifung der Retikulozyten während der Lagerung an (BUTTARELLO et al., 2001). In der eigenen Untersuchung lässt sich nach 72 Stunden mit einem Anstieg der Retikulozyten der ungekühlten und gekühlten Proben das umgekehrte Phänomen beobachten. Hierbei handelt es sich allerdings nicht um eine reale Retikulozytenerhöhung sondern um einen Lagerungsartefakt. Dies bestätigt die mikroskopische Untersuchung von nach 72 Stunden angefertigten Blutausstrichen und die Auswertung des Ergebnisreportes des ADVIA 120TM. Als Ursache für die vom Gerät ausgewiesenen erhöhten Retikulozytenzahlen müssen Koinzidenzen von Ghosts im niedrigen Absorptionsbereich und wahrscheinlich Koinzidenzen von WBC und PLT diskutiert werden (persönliche Mitteilung MORITZ, 2005). Aus den eigenen Untersuchungen ist, falls keine umgehende Messung möglich ist, die Bestimmung aus der ungekühlten Probe innerhalb von 24 Stunden vorzuziehen.

Zusammenfassend kann in Übereinstimmung mit SUCHFORT (1998) festgehalten werden, dass unabhängig von der Lagerungstemperatur die Parameter WBC, RBC und HB über 72 Stunden stabil gemessen werden können. Für verlässliche Messergebnisse von HCT, MCV, MCHC, RDW und HDW sollte die Messung aber innerhalb von 24 Stunden abgeschlossen sein. Die Anfertigung eines frischen Blutausstrichs zum Zeitpunkt der Probennahme ist sinnvoll. Für die Thrombozytenzählung wie auch die Retikulozytenzählung ist die umgehende Messung nach Probenentnahme optimal.

7.6 Fallbeispiele ADVIATM 120

Die Ergebnisdarstellung des ADVIATM 120 stellt mit seinen graphischen Darstellungen eine große diagnostische Hilfe dar. Nicht nur die Erkennung hämatopoetischer Neoplasien (TVEDTEN, 1993a), sondern auch die Beurteilung nicht maligner Veränderungen des roten und weißen Blutbildes sowie der Thrombozyten wird durch die diversen Histogramme und Zytogramme erleichtert.

Desweiteren bieten die graphischen Darstellungen und der Ergebnisreport rasch die Möglichkeit, die Plausibilität der Messung zu überprüfen.

In den folgenden Kapiteln soll daher anhand ausgesuchter Fallbeispiele die diagnostische Wertigkeit von Histogrammen und Zytogrammen für die Diagnostik erythrozytärer, leukozytärer und thombozytärer Veränderungen aufgezeigt werden. Der Ergebnisreport eines gesunden Tieres ist in Abbildung 1 dargestellt.

7.6.1 Veränderungen des roten Blutbildes

In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisdarstellungen des ADVIA™ 120 anämischer Tiere dargestellt.

Eine Anämie ist definiert als eine Verminderung der Hämoglobinkonzentration unter den Referenzbereich. Damit können –im Gegensatz zum Hämatokritwert- auch qualitativ gestörte Erythrozyten erfasst werden. Ungeachtet dessen wird in der Veterinärmedizin vor allem der Hämatokritwert als Maßstab in der Anämiediagnostik verwendet. Die Klassifikation der Anämie kann nach pathogenetischen Gesichtspunkten (Bildungsstörung oder Umsatzsteigerung) erfolgen. Die gebräuchlichste Form in der Humanmedizin ist die Klassifizierung in mikrozytäre, normozytäre und makrozytäre Anämien (MISCHKE, 2003). Mit Hilfe der Erythrozytenindizes MCV, MCHC und MCH kann die morphologische Charakterisierung der Anämie vorgenommen werden. Die Erythrozytenverteilungsbreite RDW drückt die Streuung der Erythrozytenverteilungskurve um das Maximum in % aus und stellt einen äußerst sensitiven Indikator für eine Anisozytose dar. Die Hämoglobinverteilungskurve HDW ist eine Maß für die Anisochromasie (JAIN, 1993).

Die Anzahl der Retikulozyten dient als Messgröße für die Erythrozytenproduktion des Knochenmarks (MISCHKE, 2003). Die Angabe erfolgt in % und als Absolutwert. Der Absolutwert errechnet sich wie folgt:

$$\text{Reti. (abs.) (10}^9 \text{ Zellen l}^{-1}) = \text{Reti. (\%)} \times \text{Erythrozyten (10}^{12} \text{ Zellen l}^{-1}) \times 10$$

Die drei folgenden Fallbeispiele sollen die charakteristischen morphologischen Veränderungen verschiedener Anämieformen dokumentieren.

7.6.1.1 Anämie, normozytär- normochrom (Niereninsuffizienz)

Das folgende Fallbeispiel zeigt das Erythrogramm und die Histogramme einer Katze mit einer normozytär- normochromen Anämie aufgrund einer Niereninsuffizienz.

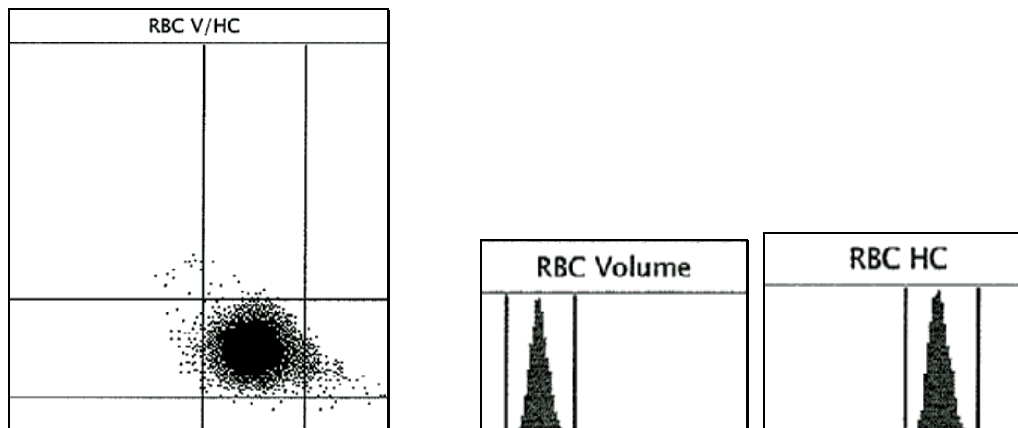


Abbildung 53: Erythrogramm (RBC V/ HV, X-Achse= Hämoglobingehalt, Y-Achse= Zellgröße), Verteilungskurven (RBC Volume, RBC HC) von Katze Nr. 20 mit einer normozytär- normochromen, nichtregenerativen Anämie, ADVIA™ 120

Mit einem erniedrigten Hämatokritwert von 21,6 % und einer erniedrigten Erythrozytenzahl stellt sich die Morphologie wie folgt dar. Die Erythrozytenpopulation befindet sich im mittleren Feld und ist somit normozytär und normochrom. Dies zeigen auch die Histogramme der Volumen- und Hämoglobinverteilungskurve. Die fehlende Regeneration wird in den folgenden Abbildungen verdeutlicht.

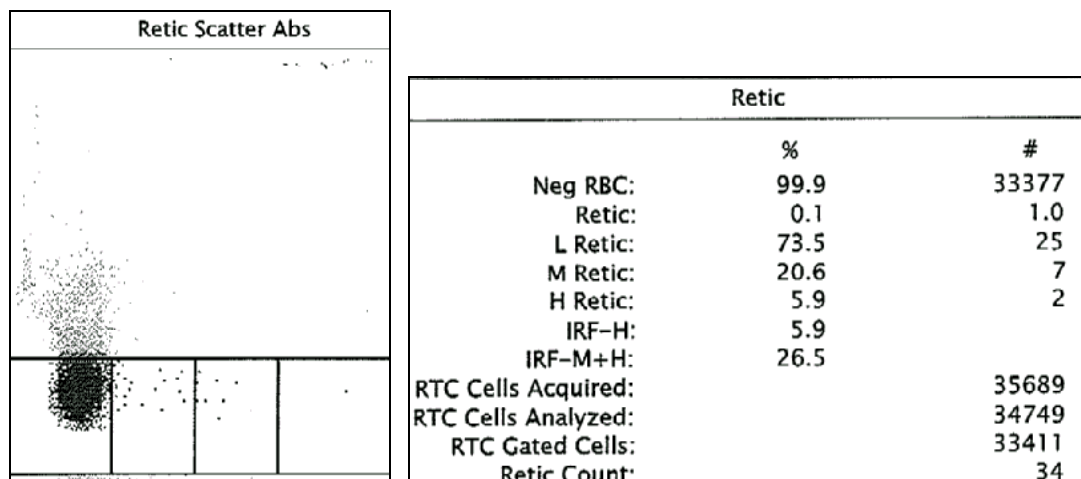


Abbildung 54: Retikulozytogramm (Retic Scatter Abs, X-Achse= Absorption, Y-Achse= Zellgröße) und Datenreport (Retic) von Katze Nr. 20 mit einer normozytär- normochromen, nichtregenerativen Anämie, ADVIA™ 120

Wie aus dem Retikulozytogramm ersichtlich ist, sind die Retikulozyten-Cluster nahezu zellfrei. Der Datenreport liefert eine absolute Retikulozytenzahl von 1×10^9 Zellen l^{-1} . Bei einem von MORITZ (2000, 2004) mit dem ADVIA™ 120 erstellten Referenzbereich von $3,6 - 94,0 \times 10^9$ Zellen l^{-1} unterstreicht diese Zahl den nicht regenerativen Charakter dieser Anämieform (MORITZ, 2000; MORITZ et al., 2004).

7.6.1.2 Anämie, hypochrom- makrozytär (FeLV- Infektion)

Das folgende Fallbeispiel zeigt die Ergebnisdarstellung einer leicht hypochrom-makrozytären Anämie.

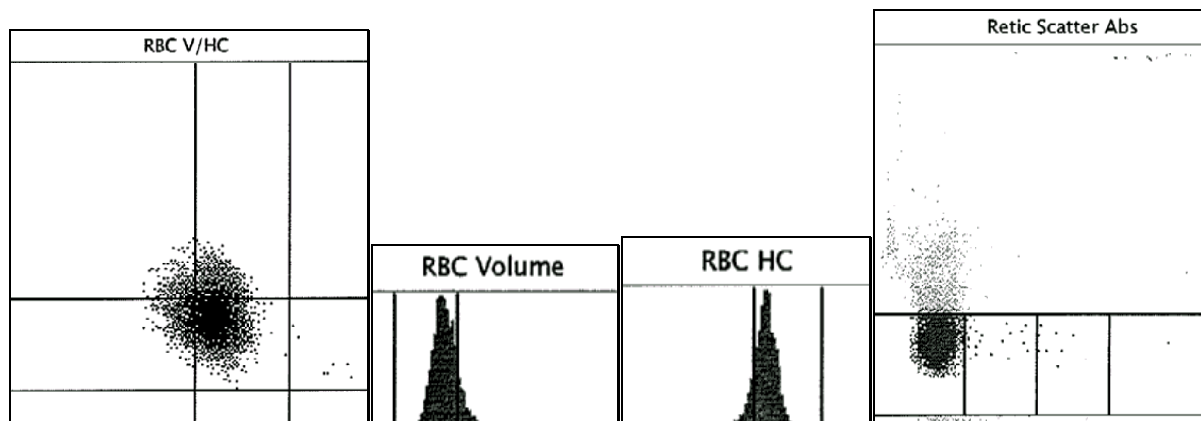


Abbildung 55: Erythrogramm (RBC V/ HV, X-Achse= Hämoglobingehalt, Y-Achse= Zellgröße), Verteilungskurven (RBC Volume, RBC HC) und Retikulozytogramm (Retic Scatter Abs, X-Achse= Absorption, Y-Achse= Zellgröße) von Katze Nr. 120 mit einer makrozytären, nichtregenerativen Anämie, ADVIA™ 120

Die Erythrozytenpopulation der Katze ist, wie aus den Abbildungen ersichtlich, in den leicht hypochrom- makrozytären Bereich verschoben. Bei dieser morphologischen Veränderung wäre eine Regeneration zu erwarten. Wie dem Retikulozytogramm allerdings zu entnehmen ist, spricht das leere Retikulozyten- Cluster für eine nicht regenerative Anämie. Makrozytäre Anämien ohne Regenerationsanzeichen sind bei der Katze als „pure red cell aplasia“ in der Literatur beschrieben. Diese Form der Anämie weist auf eine Störung der Erythropoese hin und tritt z.B. infolge einer FeLV-Infektion auf (GIGER und KOHN, 1996; MISCHKE, 2003; TVEDTEN, 1993a; WEISER und KOCIBA, 1983).

7.6.1.3 Anämie, hypochrom- makrozytär (Hämolyse)

Das folgende Fallbeispiel zeigt den charakteristischen Ergebnisreport einer Katze mit einer stark regenerativen Anämie aufgrund einer Hämolyse.

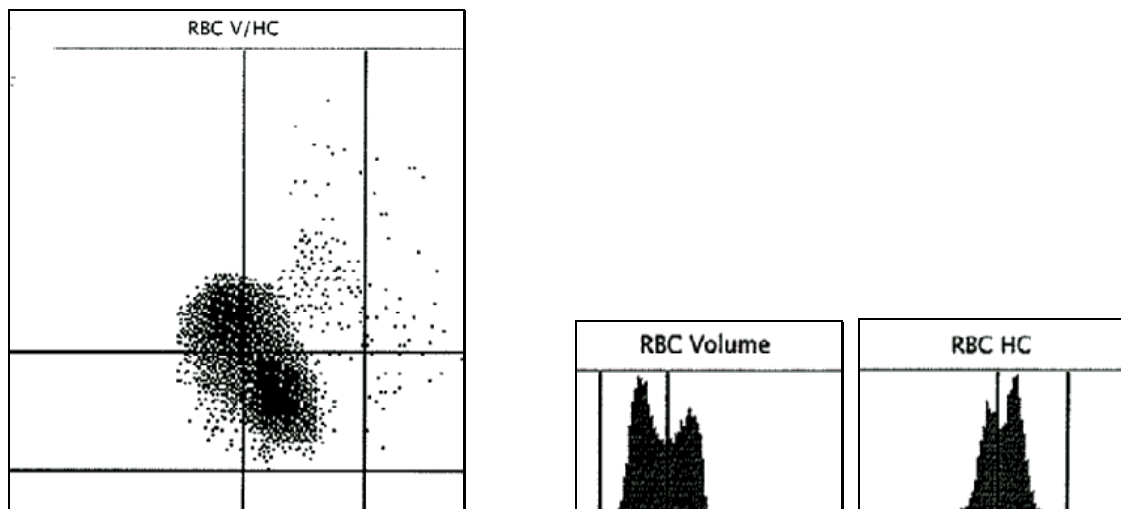


Abbildung 56: Erythrogramm (RBC V/ HV, X-Achse= Hämoglobingehalt, Y-Achse= Zellgröße), Verteilungskurven (RBC Volume, RBC HC) von Katze Nr. 284 mit einer hypochrom- makrozytären, regenerativen Anämie, ADVIATM 120

Wie den Abbildungen entnommen werden kann, weisen die Erythrozyten die für diese Anämieform typischen Veränderungen auf (MISCHKE, 2003). Im Erythrogramm streut die Erythrozytenpopulation in den hypochrom- makrozytären Bereich. Analog dazu ist die Basis der zweigipfligen Verteilungskurven verbreitert und nach rechts in den makrozytären, bzw. nach links in den hypochromen Bereich verschoben. Die Erythrozytenverteilungsbreite RDW, als Maß für eine Anisozytose, ist mit 26,6 % deutlich erhöht. MORITZ (2000, 2004) erstellt mit dem ADVIATM 120 einen Referenzbereich von 13,8 % bis 21,1 % für den Parameter RDW (MORITZ, 2000; MORITZ et al., 2004).

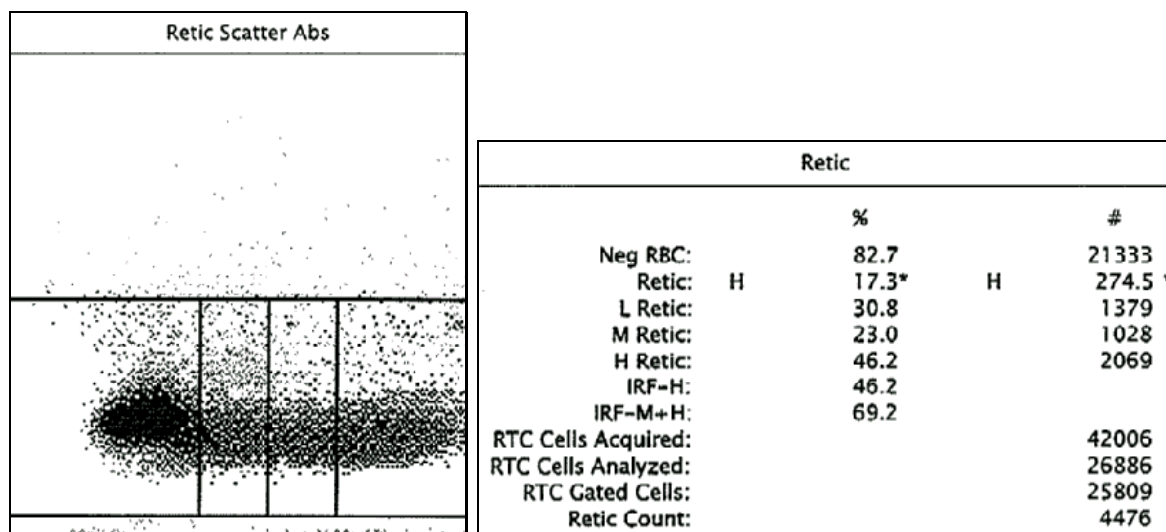


Abbildung 57: Retikulozytogramm (Retic Scatter Abs, X-Achse= Absorption, Y-Achse= Zellgröße) und Datenreport (Retic) von Katze Nr. 284 mit einer hypochrom- makrozytären, regenerativen Anämie, ADVIA™ 120

Im Retikulozytogramm ist ausgehend von den reifen Erythrozyten eine dichte Punktwolke sichtbar, die über alle Reifungsstufen hinweg nach rechts streut. Der Datenreport weist eine hochgradige Regeneration von 274×10^9 Retikulozyten l^{-1} aus, wobei die Retikulozyten hoher Reifungsstufe mit 30,8 %, die mittlerer Reifungsstufe mit 23 % und die geringer Reifungsstufe mit 46,2 % vertreten sind. Als Maß für die Knochenmarksyntheseleistung dürfen bei der Katze nur die aggregierten oder netzförmigen Formen der Retikulozyten gezählt werden (MISCHKE, 2003).

7.6.2 Normoblasten

Folgendes Beispiel zeigt den Ergebnisreport einer Katze mit einer hochgradigen Leukozytose und einer hypochrom– makrozytären Anämie. Mit $75,5 \times 10^9$ Retikulozyten l^{-1} hat diese Anämie einen regenerativen Charakter.

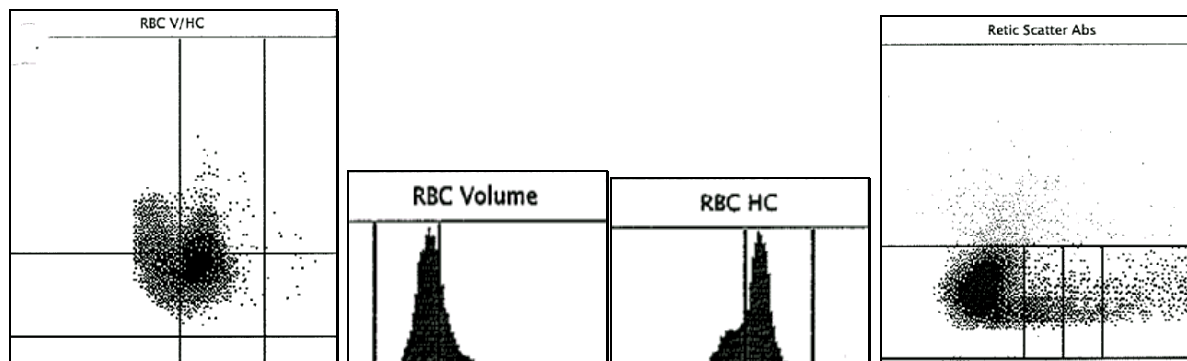


Abbildung 58: Erythrogramm (RBC V/ HC, X-Achse= Hämoglobingehalt, Y-Achse= Zellgröße), Verteilungskurven (RBC Volume, RBC HC), Retikulozytogramm (X-Achse= Absorption, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit regenerativer Anämie und Normoblasten

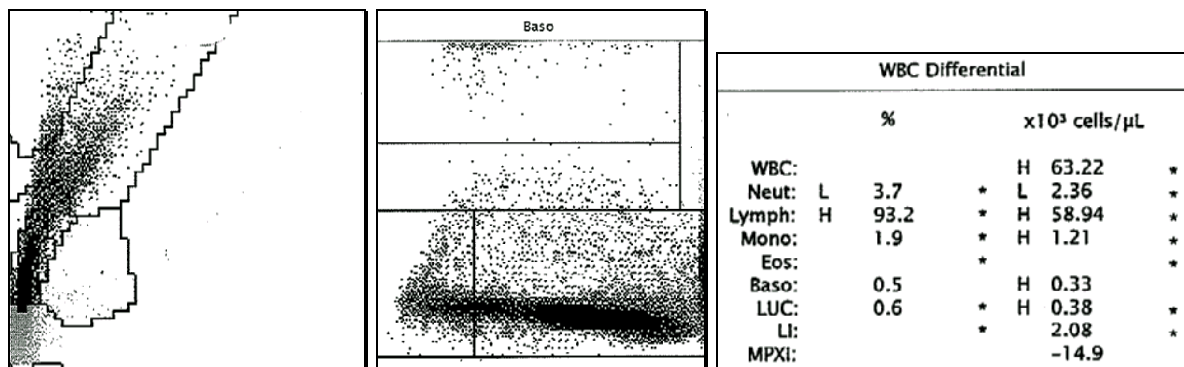


Abbildung 59: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Nukleogramm (Baso, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) und Datenreport (Routine WBC Differential) einer Katze mit regenerativer Anämie und Normoblasten

Bei Betrachtung des Leukogramms und des Nukleogramms erscheint die Messung nicht plausibel. Das Leukogramm zeigt eine dominante peroxidasenegative Population, die vom Rauschen ins Lymphozytenfeld hineinstreut. Die automatische Blutzell differenzierung ergibt eine absolute und relative Lymphozytose. Allerdings zeigt das Nukleogramm im scheinbaren Widerspruch zum Leukogramm eine dominierende Zellkernhäufung im letzten Drittel der PMN- Wolke. LeukoP und LeukoB stimmen weitgehend überein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass

- ein erhöhtes Rauschen im Peroxidasekanal,
- eine dominante peroxidasenegative Population im Lymphozyten- Cluster
- und das gleichzeitige Auftreten von Kernen im Nukleogramm, die die Eigenschaft von PMN- Zellen besitzen,

immer ein wichtiges Indiz für die Anwesenheit von Normoblasten sind und Anlass zur visuellen Nachkontrolle geben. In diesem Fall können etwa 47 Normoblasten auf 100 Leukozyten gezählt werden. Die Ursache dafür, dass sich die Normoblasten in der Population der PMN darstellen, liegt darin, dass sie ähnlich verdichtetes Kernchromatin wie die polymorphnukleären Zellen besitzen.

Bei einer hohen Anzahl an Normoblasten muss die Leukozytenzahl nach unten korrigiert werden, da die kernhaltigen Normoblasten, wie oben dargestellt, als Leukozyten gezählt werden und zu Pseudoleukozytosen führen. Dazu muss der Anteil der Normoblasten zunächst visuell ermittelt werden. Werden z.Bsp. 47 kernhaltige Normoblasten auf 100 Leukozyten gezählt, d.h. insgesamt 147 kernhaltige Zellen auf 100 Leukozyten, bedeutet das eine Division der Leukozytenzahl durch 1,47 ($147/100$) (MISCHKE, 2003). Bei Humanblut wird der Untersucher durch ein Signal auf die Anwesenheit von Normoblasten hingewiesen. In der Tiersoftware ist diese Signal noch unterdrückt, umso wichtiger ist die aufmerksame Beurteilung der graphischen Darstellungen.

7.6.3 Veränderungen des weißen Blutbildes

Veränderungen der Zahl und Zusammensetzung der weißen Blutkörperchen sind die Folge einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse und überwiegend reaktiv (MISCHKE, 2003). Die numerischen Veränderungen der Leukozytenpopulationen im Ergebnisreport können mit Hilfe der graphischen Darstellungen zum einen schneller erkannt, und zum anderen auch auf Plausibilität überprüft werden. Zur Plausibilitätskontrolle der Zytogramme gehören die Beurteilung der Lage und Form der Punktwolken, die Clustersetzung der Software bezüglich der Punktwolken und die Übereinstimmung PMN- und MN- Zellen im Leukogramm und Nukleogramm. In den folgenden Fallbeispielen sind Veränderungen der verschiedenen Leukozytenpopulationen dargestellt.

7.6.3.1 Neutrophile Granulozyten

7.6.3.1.1 Neutrophilie

Folgendes Beispiel zeigt den Ergebnisreport einer an FIP erkrankten Katze.

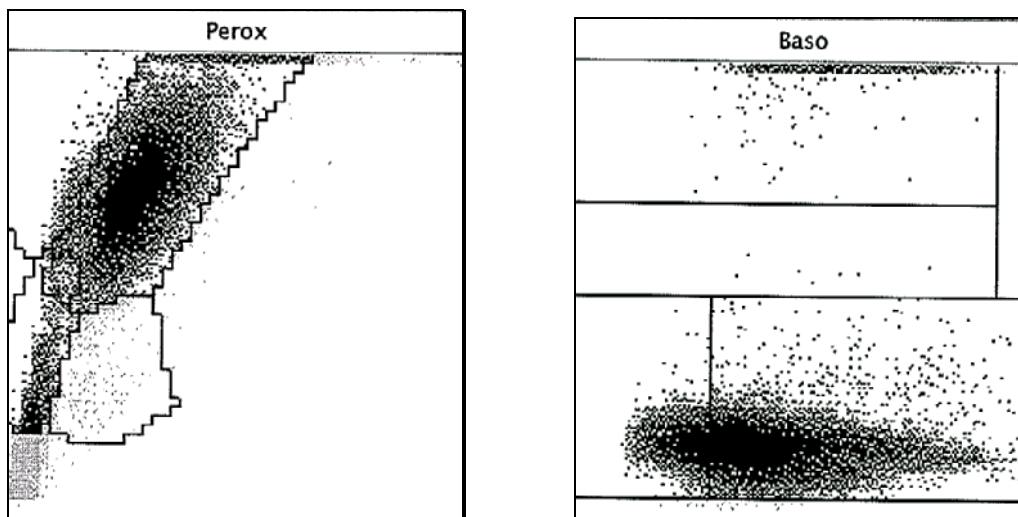


Abbildung 60: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Nukleogramm (Baso, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit FIP, ADVIA™ 120

Bei einer Leukozytose von $29,15 \times 10^3$ Zellen μl^{-1} enthält das Leukogramm eine deutliche Neutrophilenwolke, im Basophilenkanal dominiert in Übereinstimmung mit dem Leukogramm der PMN- Bereich. Die visuelle Nachdifferenzierung bestätigt die Neutrophilie, allerdings können auch 7 % Stabkernige Neutrophile Granulozyten beobachtet werden, die mit dieser Softwareeinstellung vom Gerät noch nicht durch Beflagung oder semiquantitative Angabe ausgewiesen werden. Dieses Beispiel zeigt die Notwendigkeit der visuellen Nachkontrolle.

7.6.3.1.2 Degenerative Linksverschiebung

Das folgende Beispiel verdeutlicht, wie hilfreich die graphischen Darstellungen des ADVIA™ 120 sind. Bei dem vorgestellten Patienten wird ein kleines Blutbild angefordert. Wie dem Datenreport zu entnehmen ist, weist das kleine Blutbild bis auf eine leichte Leukozytose von $14,3 \times 10^3$ Zellen μl^{-1} keine Veränderungen auf. Bei Betrachtung des Nukleogramms fällt allerdings eine dominante Anhäufung im

Bereich der MN- Population auf. Nur verhältnismäßig wenige Zellen streuen in den polymorphnukleären Bereich.

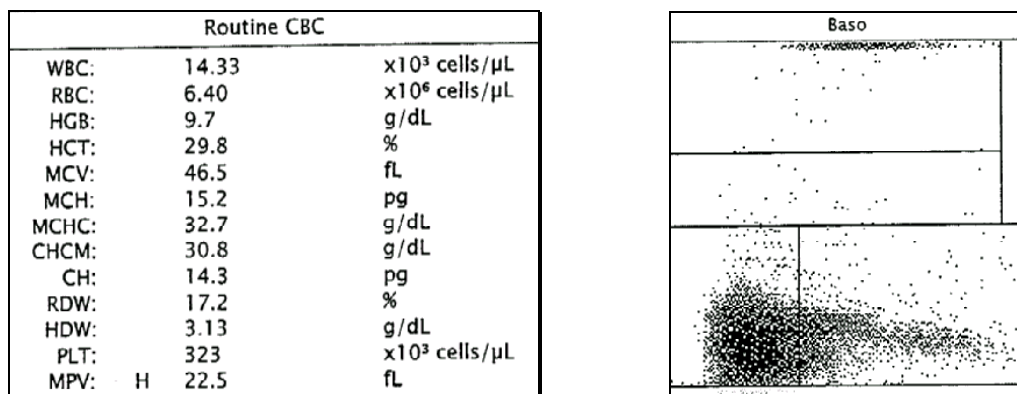


Abbildung 61: Datenreport (Routine CBC) und Nukleogramm (Baso. X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit degenerativer Linksverschiebung, ADVIATM 120

Diese Veränderung ist Anlass zur Anfertigung eines Differenzialblutbildes. Die Ergebnisse zeigt folgende Abbildung.

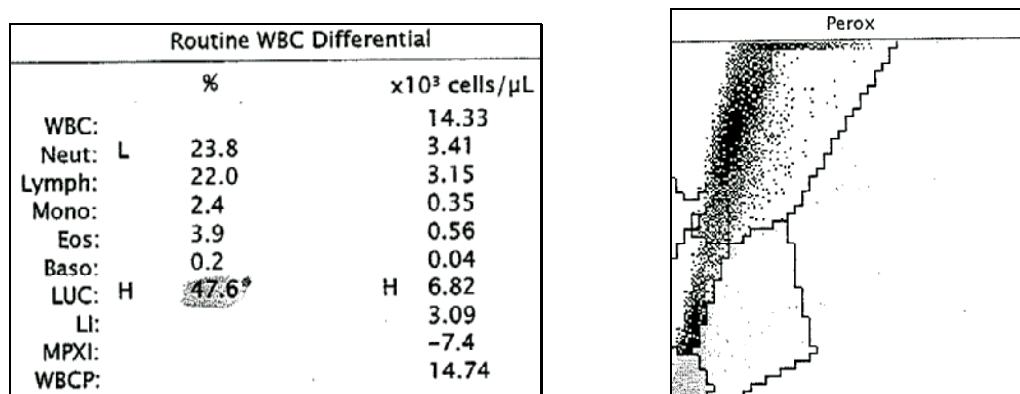


Abbildung 62: Datenreport (WBC Differential) und Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit degenerativer Linksverschiebung, ADVIATM 120

Im automatischen Differenzialblutbild wird eine enorme Erhöhung (47,6 %) der large unstained cells (LUC) reportiert. Dieser Wert steht auch in Übereinstimmung mit dem Leukogramm, wo sich eine dichte Zellpopulation im LUC- Cluster nahe der Grenze zum Neutrophilen- Cluster befindet. In dem Neutrophilen- Cluster sind nur vereinzelt Zellen sichtbar. Dieses Ergebnis erfordert zwingend eine mikroskopische Kontrolle.

Bei der visuellen Differenzierung ist eine geringgradige Leukozytose nachweisbar. Reife Neutrophile Granulozyten finden sich kaum, dagegen sind fast ausschließlich

sehr große Stabkernige Neutrophile Granulozyten mit toxischer Granulation und basophilem Zytoplasma zu sehen. Vereinzelt finden sich Monozyten und sehr große Neutrophile Granulozyten mit ringförmigem Nukleus. Dieser Befund spricht für eine degenerative Linksverschiebung aufgrund einer Intoxikation oder schweren Infektionserkrankung. Eine degenerative Linksverschiebung, als Indikator für eine Erschöpfung des Reservepools der Neutrophilen im Knochenmark, ist dadurch gekennzeichnet, dass der Anteil unreifer Zellen mehr als 10 % der Gesamtneutrophilenzahl bei verminderter, normaler oder leicht erhöhter Neutrophilenzahl beträgt (MISCHKE, 2003).

Dieses Ergebnis der visuellen Differenzierung steht im Widerspruch zum automatisierten Differenzialblutbild, das mit 47 % LUC eine hämatopoetische Neoplasie vermuten lässt. Wie die mikroskopische Untersuchung allerdings zeigt, wird diese Population durch die größeren peroxidaseschwächeren Stabkernigen Neutrophilen Granulozyten verursacht, die nach links in das LUC-Cluster fallen und als solche dann reportiert werden. Dieses Beispiel verdeutlicht die Chancen, aber auch die Grenzen der automatischen Blutzellanalytik des ADVIATM 120. Die automatische Zelldifferenzierung ohne visuelle Kontrolle hätte zum einen zu einer Fehldiagnose geführt, zum anderen wäre ohne die Information aus dem Nukleogramm aufgrund des relativ unauffälligen Blutbildes keine Differenzierung und damit auch keine richtige Diagnosestellung erfolgt.

peroxidasegefärbte Zellen (LUC) finden sich nicht. Eine virologische Stuhluntersuchung ergibt den Nachweis von felinem Parvovirus. Die Leukopenie in Verbindung mit einer Neutropenie wird zum einen durch eine Zerstörung der Stammzellen und zum anderen durch einen vermehrten Verbrauch von Neutrophilen verursacht (KRAFT et al., 1980; MISCHKE, 2003).

7.6.3.2 Eosinophile Granulozyten

Das folgende eindrucksvolle Fallbeispiel soll stellvertretend für Erhöhungen der Eosinophilen- Zahlen stehen.

7.6.3.2.1 Hypereosinophiles Syndrom

Das Beispiel zeigt eine Katze mit einer hochgradigen Leukozytose von $70,18 \times 10^3$ Zellen μL^{-1} .

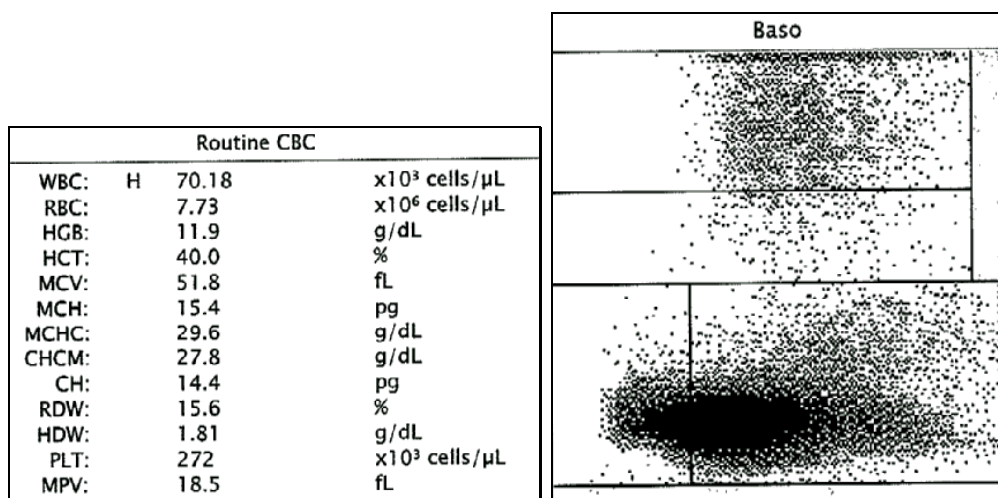


Abbildung 64: Datenreport (Routine CBC) und Nukleogramm (Baso, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit Hypereosinophilen Syndrom, ADVIATM 120

Im Nukleogramm ist eine bauchige Verdickung des gedrunenen Wurmkörpers mit deutlicher Betonung des polymorphnukleären Bereichs zu sehen. Der erste Verdacht lässt eine Neutrophilie mit Linksverschiebung aufgrund des nicht vorhandenen Tals zwischen Wurmkörper und Wurmkopf vermuten.

Nach Differenzierung wird im Leukogramm auch eine scharf abgegrenzte Punktwolke im Neutrophilen- Cluster sichtbar.

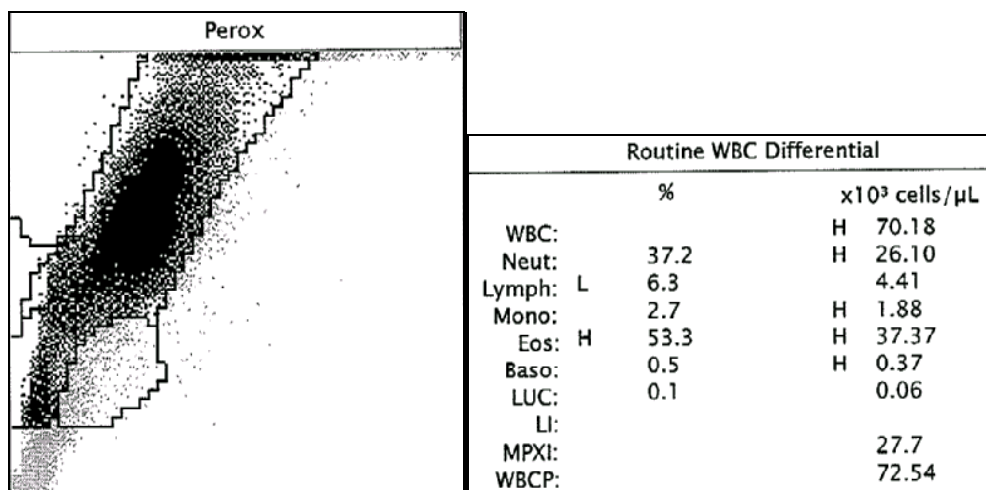


Abbildung 65: Leukogramm (Peroxis, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Datenreport (WBC Differential) einer Katze Hypereosinophilem- Syndrom, ADVIA™ 120

Bei Studium des Datenreports allerdings zeigt sich eine hochgradige Eosinophilie (53,3 %). Die eingeleitete visuelle Kontrolle bestätigt die automatische Differenzierung. Eine persistierende Bluteosinophilie von mindestens $1,5 \times 10^3$ Zellen μL^{-1} ist charakteristisch für das Hypereosinophilen Syndrom (SCHULZ et al., 2001). Die Abgrenzung zur Eosinophilenleukämie ist schwierig und wird anhand der Reifungsstadien der Eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut und den infiltrierten Organen getroffen (MISCHKE, 2003). Die peroxidasenegativen Eosinophilen Granulozyten fallen aufgrund der Eigenabsorption ihrer Granula in den Messbereich der peroxidasepositiven Neutrophilen Granulozyten. Sie bilden kein eigenes, klar abgrenzbares Cluster (TVEDTEN und KORCAL, 1996), sondern verschmelzen, wie im Leukogramm ersichtlich ist, mit den Neutrophilen Granulozyten. Die Analyse der Eosinophilen erfolgt mit der neuen Messtechnik im Retikulozytenkanal (Kap. 5.3.3). Die Zahl der im Neutrophilen- Cluster erfassten Zellen wird um die Retikulozytenkanal erfassten Eosinophilen reduziert.

Dieses extreme Beispiel einer Eosinophilie soll verdeutlichen, dass die Zytogramme keinen Hinweis auf die Eosinophilen Granulozyten liefern, sondern dass in diesem Fall der Datenreport die Diagnose liefert. Dieses Ergebnis erfordert auf jeden Fall eine visuelle Kontrolle.

7.6.3.3 Lymphozyten

7.6.3.3.1 Lymphozytose

Folgende Abbildungen zeigen den Ergebnisreport einer Katze mit einer chronischen Gingivitis.

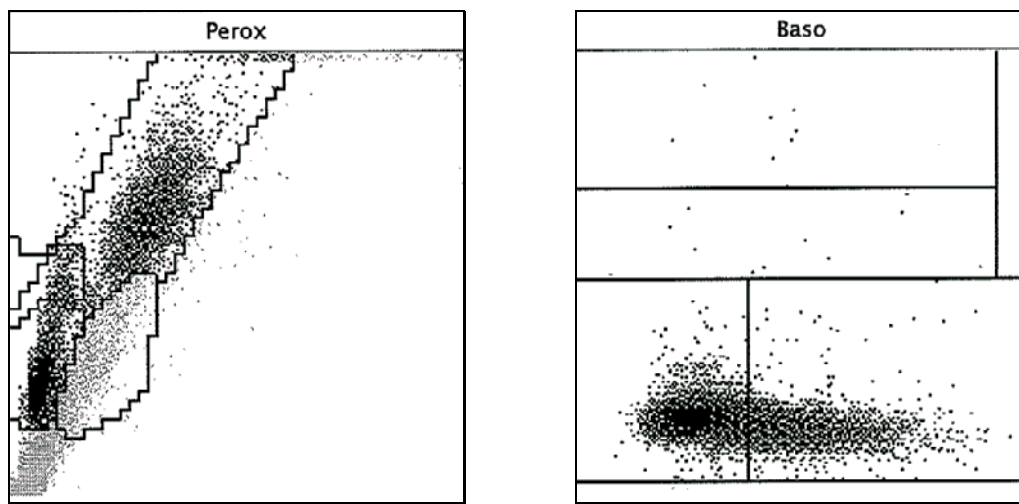


Abbildung 66: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Nukleogramm (Baso, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit chronischer Gingivitis, ADVIATM 120

In beiden Messkanälen zeigen sich übereinstimmende Ergebnisse. Im Leukogramm ist die Punktwolke im Lymphozyten- Cluster verdichtet, während das Nukleogramm eine Betonung des mononukleären Bereichs aufweist.

7.6.3.4 Fehlende Plausibilität: LeukoB/ LeukoP

Das folgende Beispiel zeigt eine hochgradige Leukozytose von $102,7 \times 10^9$ Zellen l^{-1} einer Erythropenie von $2,7 \times 10^{12}$ Zellen l^{-1} und einen erniedrigten Hämatokritwert von $0,12 \text{ l l}^{-1}$.

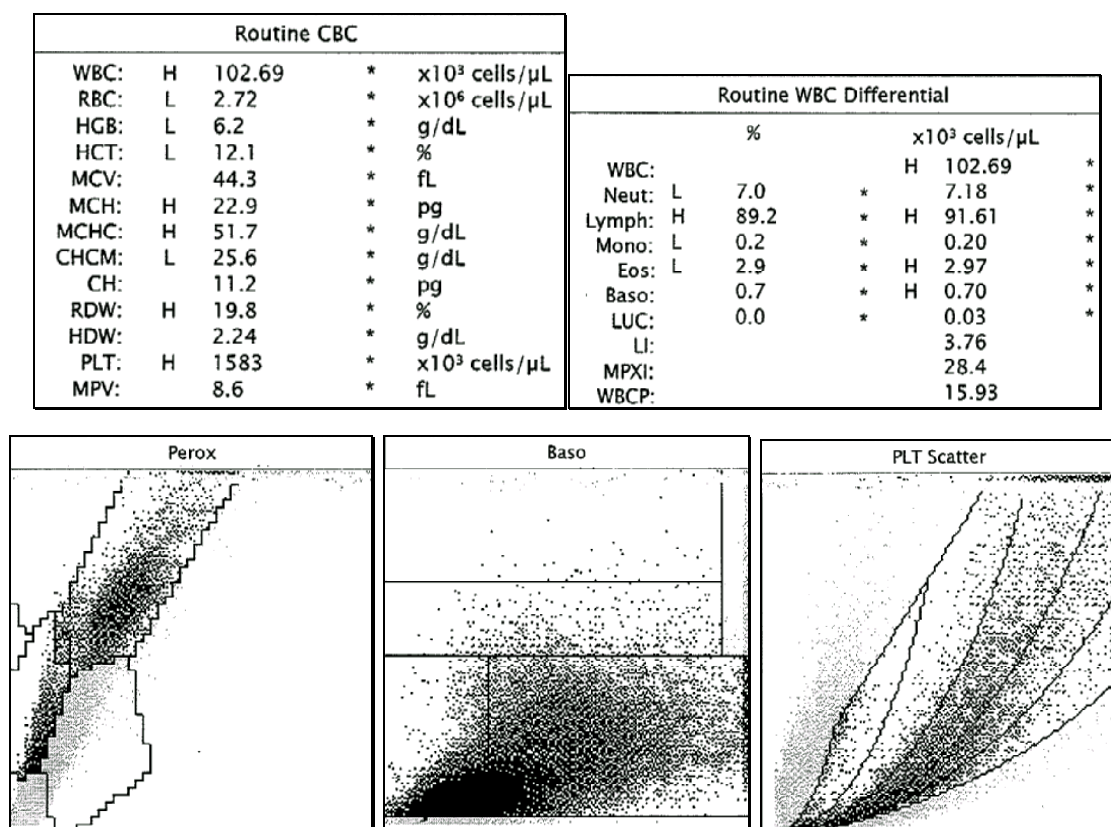


Abbildung 67: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Nukleogramm (Baso, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße), Thrombogramm (PLT Scatter, X-Achse= Hochwinkelsignal, Y-Achse= Niedrigwinkelsignal), Datenreport (Routine CBC und WBC Differential) einer Katze mit unplausibler Messung aufgrund massiver Hämolyse

Bei Betrachtung der internen Plausibilitätskontrollen bezüglich des roten Blutbildes fällt eine deutliche Differenz des MCHC und CHCM auf, die mit $26,1 \text{ g dl}^{-1}$ weit über der zu dulddenden Differenz von $1,9 \text{ g dl}^{-1}$ liegt. Die Ursachen für eine solche Differenz kann z.B. eine massive Hämolyse sein. Neben fehlender Plausibilität beim roten Blutbild zeigt das Gerät auch beim weißen Blutbild widersprüchliche Ergebnisse auf. So beträgt die im Peroxidasekanal reportierte Leukozytenzahl nur $15,9 \times 10^9$ Zellen l^{-1} . Deutlich wird diese Diskrepanz auch im Leuko- und Nukleogramm. Während das Leukogramm unauffällig erscheint, zeigt sich im Baso-Scatter im unteren linken Bereich eine dichte Punktwolke. Ursächlich kommen hier neben Schmutz auch Zelltrümmer in Frage. Bei Betrachtung des Thrombogramms sind deutlich Erythrozytenfragmente und Erythrozytenmembranen zu sehen.

Mit Hilfe der graphischen Darstellungen wird diese Messung schnell als unkorrekt entlarvt und bedingt neben einer technischen Kontrolle des Basophilenkanals eine Wiederholungsmessung und eine mikroskopischen Nachkontrolle.

7.6.4 Thrombozyten

Die neue zweidimensionale Thrombozytenanalytik des ADVIA™ 120 ermöglicht zum einen die von interferierenden Teilchen unbeeinflusste Thrombozytenanalyse (Kap.5.5), zum anderen werden die vom Gerät im Peroxidasekanal erfassten Thrombozytenagglutinate vom Gerät numerisch reportiert. Folgendes Beispiel stellt den Ergebnisreport einer Pseudothrombozytopenie und einer echten Thrombozytopenie vor.

7.6.4.1 Echte Thrombozytopenie/ Pseudothrombozytopenie

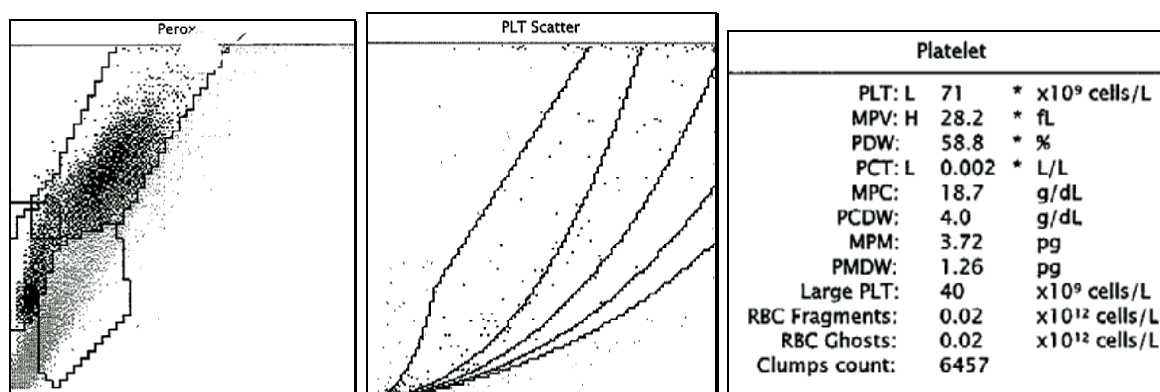


Abbildung 68: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Thrombogramm (X-Achse= Hochwinkelsignal, Y-Achse= Niedrigwinkelsignal) und Datenreport (Platelet) einer Katze mit einer Pseudothrombozytopenie, ADVIA™ 120

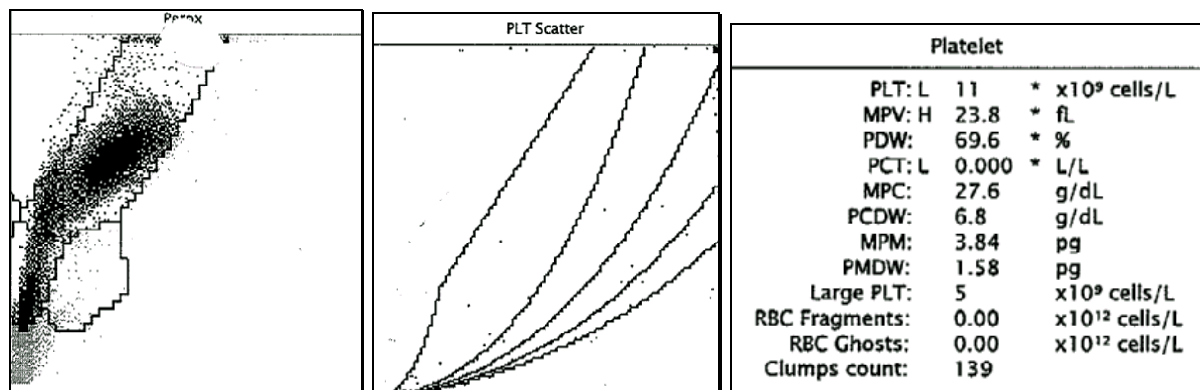


Abbildung 69: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Thrombogramm (X-Achse= Hochwinkelsignal, Y-Achse= Niedrigwinkelsignal) und Datenreport (Platelet) einer Katze mit einer echten Thrombozytopenie, ADVIATM 120

In Abbildung 68 ist im Leukogramm deutlich eine im Winkel von ca. 60° aufstrebende Punktwolke sichtbar, deren Ursprung im Feld „Rauschen“ liegt. Im daneben abgebildeten Thrombogramm sind nur ganz vereinzelt Zellen im Messbereich erkennbar. Die dementsprechend im Datenreport resultierte Thrombozytenzahl ist falsch niedrig. Ohne die numerische Angabe der „Clumps Count“ und vor allem die graphische Darstellung der Thrombozytenagglutinate im Perox- Scatter wäre es hier zu einer Fehlinterpretation gekommen. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 69 eine echte Thrombopenie mit 11×10^9 Zellen l^{-1} abgebildet, im Leukogramm ist keine 60°- Population sichtbar.

7.6.4.2 Aktivierungsgrad der Thrombozyten

Die folgenden Abbildungen stellen vergleichend die graphischen Ergebnisdarstellungen aktivierter und nicht aktivierter Thrombozyten dar.

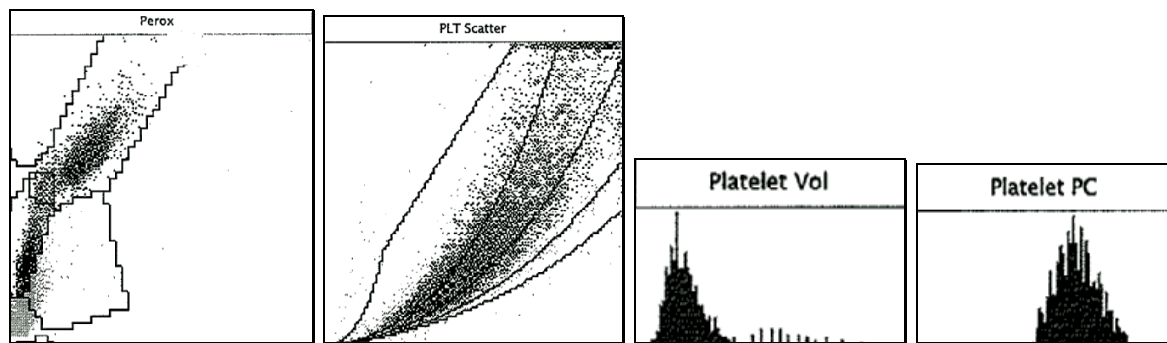


Abbildung 70: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Thrombogramm (PLT Scatter, X-Achse= Hochwinkelsignal, Y-Achse= Niedrigwinkelsignal), Volumenverteilungskurven (Platelet Vol, Platelet PC) von Katze Nr. 204 ohne Thrombozytenagglutinate und kleinen nicht aktivierten Plättchen, ADVIA™ 120

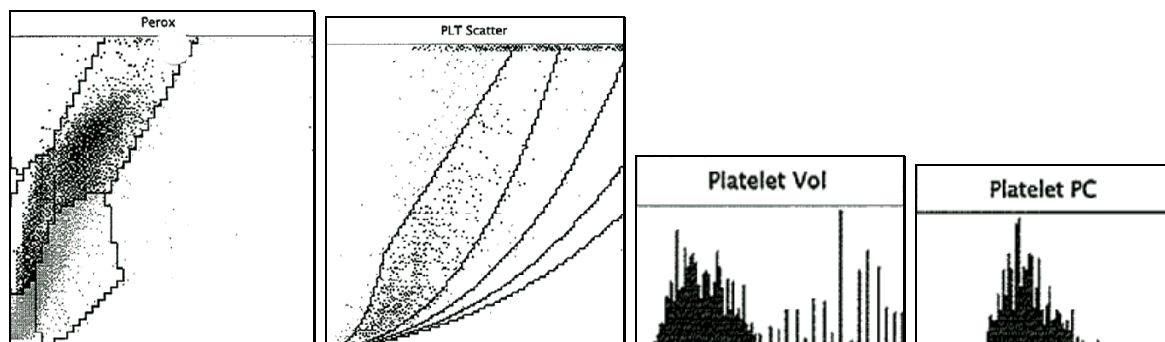


Abbildung 71: Leukogramm (Perox, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße), Thrombogramm (PLT Scatter, X-Achse= Hochwinkelsignal, Y-Achse= Niedrigwinkelsignal), Volumenverteilungskurven (Platelet Vol, Platelet PC) von Katze Nr. 154 mit Thrombozytenagglutinaten und vermehrt großen, degranulierten Plättchen, ADVIA™ 120

In Abbildung 70 sind keine Thrombozytenagglutinate vorhanden, das Mittlere Plättchenvolumen beträgt 13,9 fl und die Konzentration der Inneren Bestandteile der Thrombozyten 25,3 g dl⁻¹. Im Thrombogramm liegt die Punktvolke in der unteren Hälfte nahe der Brechungsindexlinie $n = 1,4$ des Mie-Scatters. Die Volumenverteilungskurve ist lognormal und rechtsschief, während die Volumenverteilungskurve für den Parameter MPC normalverteilt ist und sich in der rechten Hälfte des Zytogramms befindet. Die Blutprobe in Abbildung 71 zeigt deutlich Thrombozytenagglutinate und große aktivierte Thrombozyten mit einem MPV von 23,5 fl und einem MPC von 17,9 g dl⁻¹. Die Punktvolke im Thrombogramm ist angehoben in Richtung Brechungsindex $n = 1,35$. Die Volumenverteilungskurve für das MPV ist nicht mehr lognormal und nach rechts hin zu den großen Thrombozyten

verbreitert. Die Verteilungskurve für das MPC ist im Zytogramm nach links verschoben, hin zu weniger dichten Plättchen. Diese größeren und weniger dichten Plättchen sind ein Maß für den Aktivierungsgrad der Thrombozyten (JAIN, 1993; ZELMANOVIC und HETHERINGTON, 1998).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die graphischen Darstellungen des ADVIA™ 120 eine wichtige Information bei der Diagnose echter Thrombopenien liefern. Ein grosser Fortschritt stellt die zweidimensionale koinzidenzfreie Thrombozytenanalytik dar, die auch graphisch eine Beurteilung der Thrombozytenmorphologie und des Aktivierungsgrades ermöglicht.

7.6.5 Maligne Veränderungen

In den abschließenden Kapiteln werden die Ergebnisreporte des ADVIA™ 120 verschiedener hämatopoetischer Neoplasien vorgestellt.

7.6.5.1 Lymphatische Leukämie (1)

Die folgenden zwei Ergebnisdarstellungen zeigen die typischen Veränderungen bei einer lymphatischen Leukämie, die dem erfahrenen Untersucher schon bei Begutachtung der Zytogramme die Verdachtsdiagnose liefert. Eine visuelle Kontrolle ist aber in jedem Fall erforderlich.

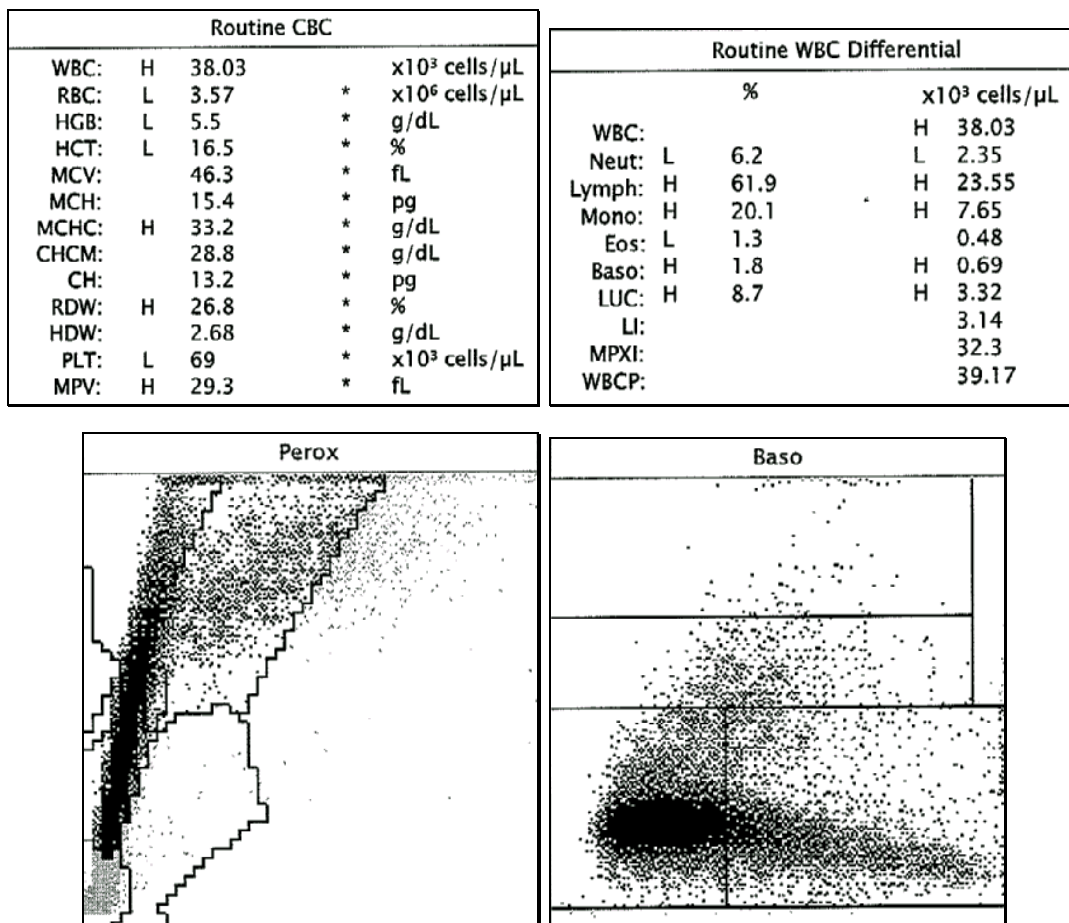


Abbildung 72: Datenreport (Routine CBC), Datenreport (WBC Differential), Leukogramm (Peroxiside, X-Achse= Peroxisidgehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Nukleogramm (Basophil, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit lymphatischer Leukämie, ADVIA™ 120

Wie der Abbildung 72 zu entnehmen ist, zeigt die Katze eine deutliche Leukozytose mit $38,03 \times 10^3$ Zellen μL^{-1} und laut automatischer Differenzierung eine relative und absolute Lymphozytose, Monozytose und Erhöhung der LUCs. Bei Betrachtung der Zytogramme fällt eine scharf abgegrenzte, steil nach oben ziehende, zusammenhängende Punktwolke auf, die ihren Ursprung im Lymphozyten-Cluster hat und über das Monozyten-Cluster hinweg bis in das LUC-Cluster reicht. Das Nukleogramm zeigt eine extrem Verdichtung von mononukleären Zellen, aus deren Bereich lyseresistente Zellen in das Basophilen-Cluster streuen. Die Neutrophilen bzw. polymorphnukleären Zellen sind im Vergleich nur sehr schwach ausgeprägt. Dieser Befund erfordert in jedem Fall eine visuelle Differenzierung, die massenhaft kleine und mittelgroße reife Lymphozyten mit grober Chromatinstruktur und lymphatische Blasten mit bis zu drei Nukleoli ergibt. Diese lymphatischen Zellen werden durch die

steil nach oben ziehende Punktwolke repräsentiert. Die vom Gerät reportierte Monozytose kann nicht bestätigt werden. Hier interpretiert die Software die über das Monozyten- Cluster hinwegziehende Punktwolke als Monozyten. Das automatische Differenzierungsergebnis ist daher nicht korrekt. Nach Ausschluss eines malignen Lymphoms Stadium V wird die Diagnose lymphatische Leukämie gestellt.

7.6.5.2 Lymphatische Leukämie (2)

Folgendes Fallbeispiel soll eine weitere Ergebnisdarstellung des ADVIA™ 120 bei einer lymphatischen Leukämie repräsentieren.

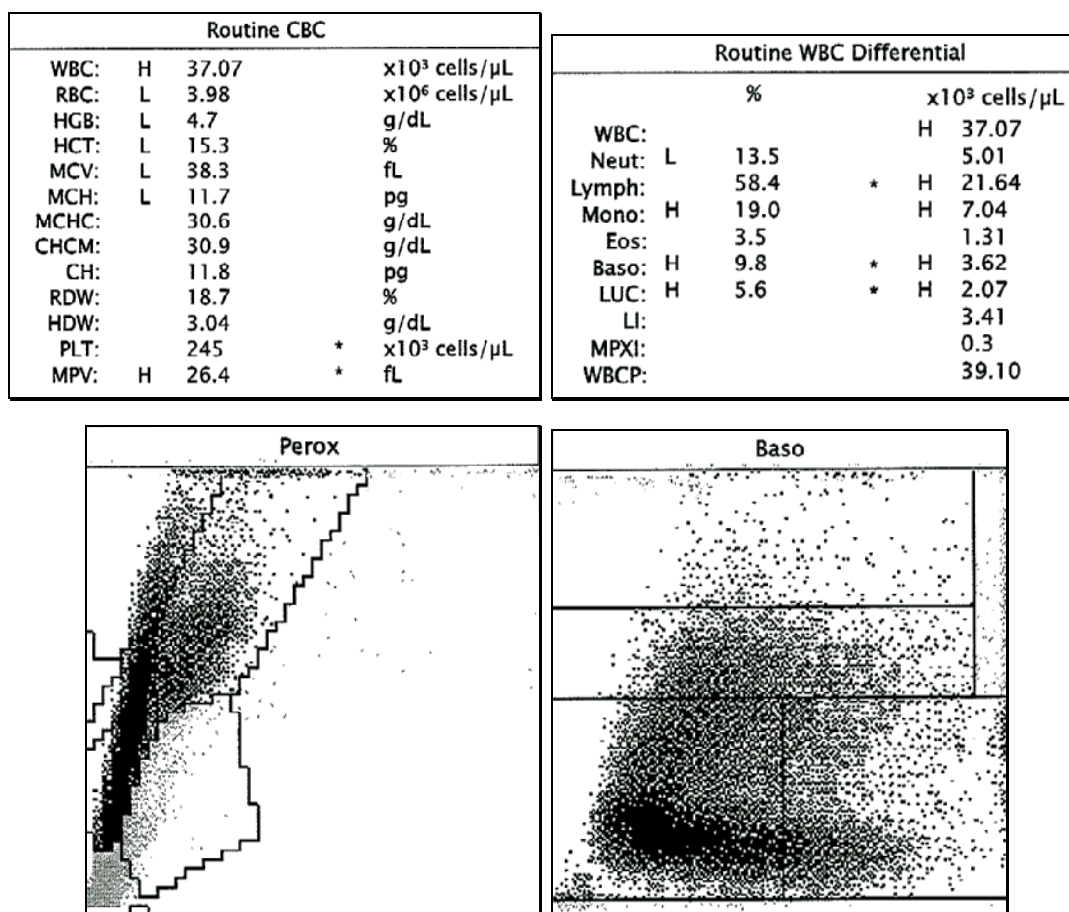


Abbildung 73: Datenreport (Routine CBC), Datenreport (WBC Differential), Leukogramm (Peroxiside, X-Achse= Peroxidasegehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Nukleogramm (Basophilic, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit lymphatischer Leukämie, ADVIA™ 120

Ähnlich wie bei dem vorherigen Fallbeispiel fällt im Leukogramm die steil nach oben ziehende Punktwolke auf. Im Nukleogramm liegt zwar die Betonung auf dem mononukleären Bereich, allerdings zeigt sich der „Wurmkopf“ nicht so scharf abgegrenzt wie in dem 1. Fallbeispiel der lymphatischen Leukämie. Es streuen deutlich mehr lyseresistente Zellen ins Basophilen-Cluster. Die mikroskopische Kontrolle ergibt zahlreiche lymphatische Blasten unterschiedlicher Reifungsstufe mit deutlichen Malignitätskriterien, die nach Ausschluss eines Malignen Lymphoms, Grad V die Diagnose einer lymphatischen Leukämie erbringt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe der graphischen Darstellungen des ADVIATM 120 der geübte Untersucher schon anhand der charakteristisch veränderten Zytogramme die Verdachtsdiagnose lymphatische Leukämie äußern kann. Eine visuelle Nachdifferenzierung ist aber in jedem Fall erforderlich.

7.6.5.3 Malignes Lymphom, Grad V

Das folgende Fallbeispiel zeigt den Ergebnisausdruck des ADVIA™ 120 einer Katze mit Malignem Lymphom, Grad V.

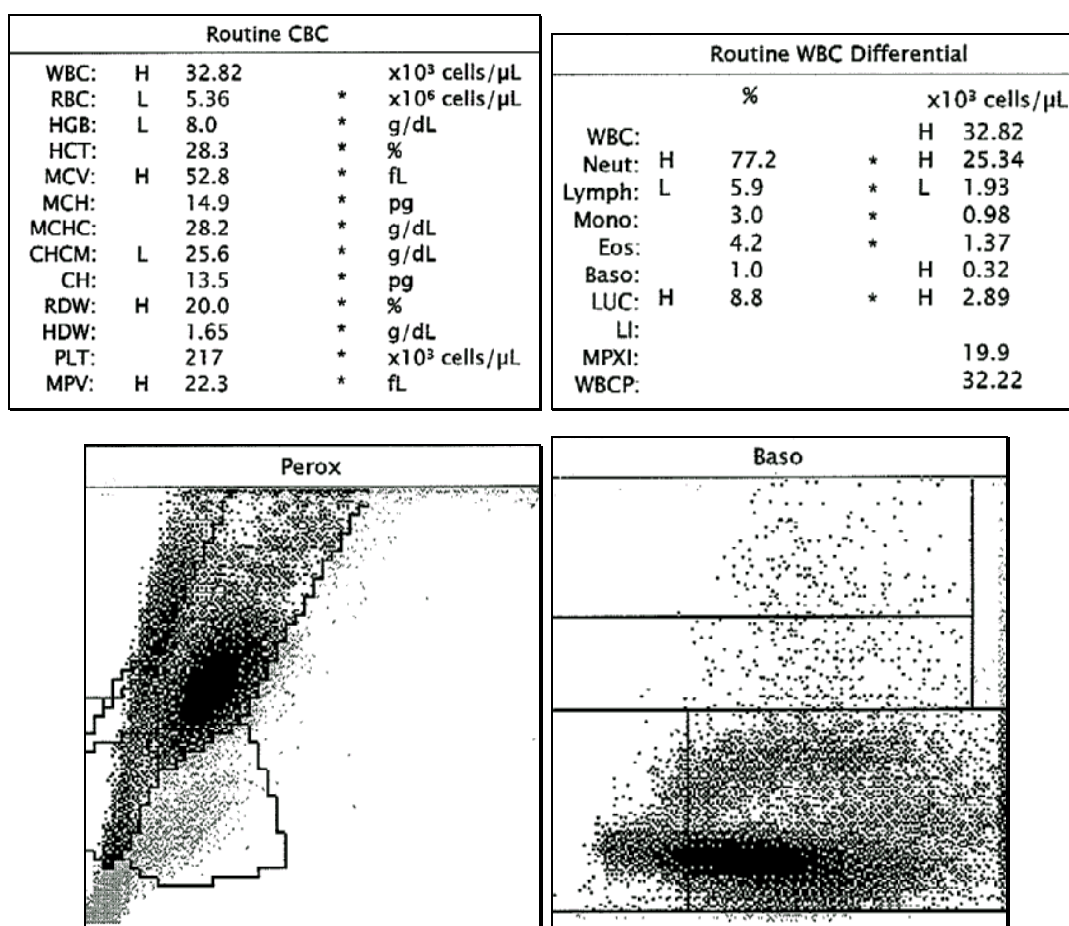


Abbildung 74: Datenreport (Routine CBC), Datenreport (WBC Differential), Leukogramm (Peroxiside, X-Achse= Peroxisidgehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Nukleogramm (Baso, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit einem Malignen Lymphom, Grad V, ADVIA™ 120

Wie in der Abbildung 74 zu sehen ist, dominiert im Leukogramm die Neutrophilen-Wolke. Links oberhalb ist noch eine weitere Punktwolke im LUC- Cluster ersichtlich, die der ADVIA™ 120 im automatischen Differenzialblutbild mit 8,8 % LUC resultiert. Dieser Wert verlangt eine manuelle Differenzierung. Bei der mikroskopischen Kontrolle bestätigt sich die hochgradige Leukozytose mit einer hochgradigen Neutrophilie ohne Linksverschiebung. Desweiteren finden sich neben einigen

Eosinophilen Granulozyten und kleinen reifen Lymphozyten einige lymphatische Blasten, die einen meist zentralen Kern und vereinzelt prominente Nukleoli und basophiles Zytoplasma aufweisen. Anhand des klinischen Stagings kann die Diagnose des bei der Katze seltenen Malignen Lymphoms Grad V, mit Infiltration der Tumorzellen ins Knochenmark und Ausschwemmung ins periphere Blut, gestellt werden (MISCHKE, 2003). Der ADVIA™ 120 identifiziert im Leukogramm die Blasten und fordert hiermit den Untersucher zu weiterer Untersuchung auf. Differenzialdiagnostisch kommt noch eine lymphatische Leukämie in Frage.

7.6.5.4 Myelomonozytäre Leukämie

Bei dem folgenden Fallbeispiel handelt es sich um eine Katze mit einer myelomonozytären Leukämie.

Diagnose einer myelomonozytären Leukämie (M4). Differenzialdiagnostisch kommt eine leukämoide Reaktion in Betracht. Dieses Beispiel verdeutlicht die unumgängliche manuelle Differenzierung. Zwar weist das Gerät eine deutliche Neutrophilie und Monozytose korrekt aus, die Vorstufen und die höchstgradige Linksverschiebung werden aber mit diesen Systemeinstellungen noch nicht erkannt bzw. durch Warnsignale angezeigt.

7.6.5.5 Myelodysplastisches Syndrom (MDS)

Folgendes Ergebnis erbringt die automatische Blutzellzählung einer 3 Jahre alten männlichen EKH- Katze mit Schwäche, Anorexie und blassen Schleimhäuten.

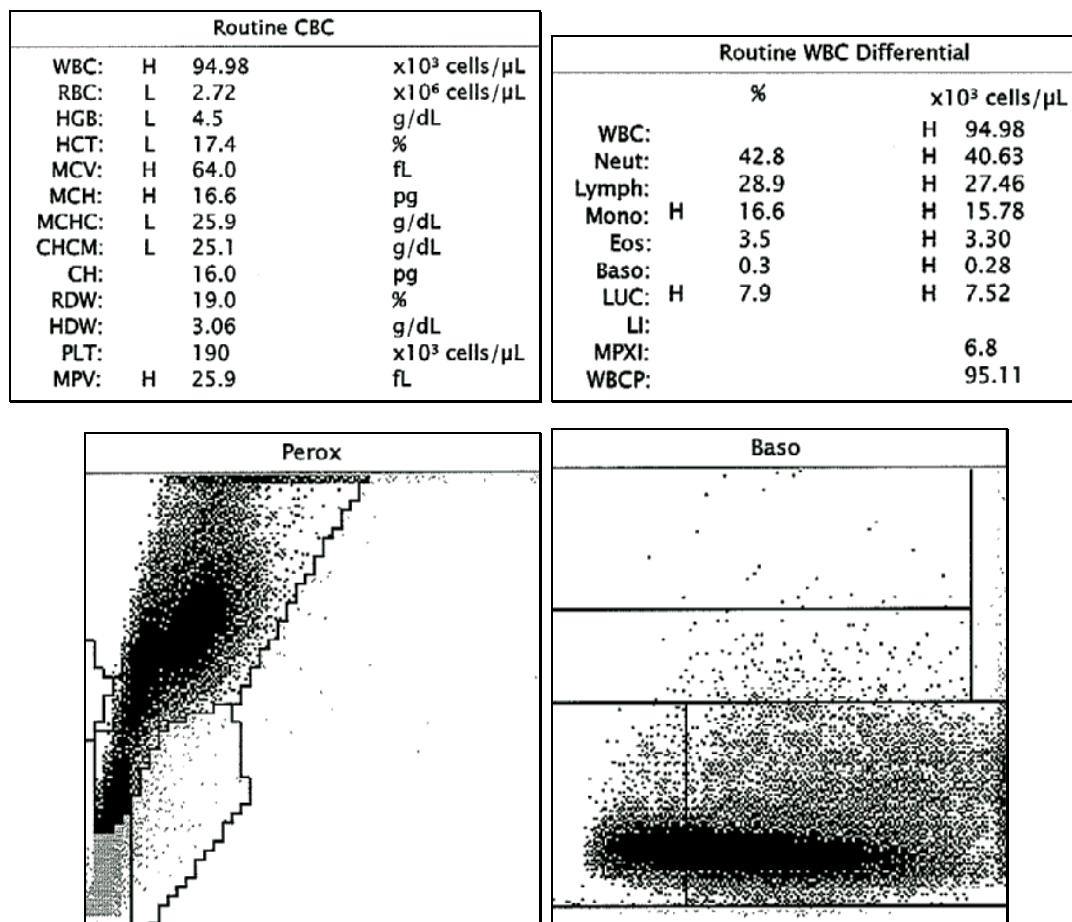


Abbildung 76: Datenreport (Routine CBC), Datenreport (WBC Differential), Leukogramm (Peroxiside, X-Achse= Peroxisidegehalt, Y-Achse= Zellgröße) und Nukleogramm (Baso, X-Achse= Zellkernchromatindichte, Y-Achse= Zellgröße) einer Katze mit Myelodysplastischem Syndrom, ADVIATM 120

Wie aus dem Ergebnisreport hervorgeht, zeigt sich eine höchstgradige Leukozytose ($94,98 \times 10^3$ Zellen μ L⁻¹) mit einer prozentualen Monozytose und Erhöhung der LUCs und einer absoluten Vermehrung aller Zellreihen. Die rote Zellreihe ist vermindert. Im Leukogramm zieht aus dem Rauschen eine dichte Population ins Lymphozyten-Cluster. Zwei weitere Punktwolken sind sichtbar, eine streut vom Monozytenfeld ins LUC- Cluster, die andere befindet sich im linken Bereich des Neutrophilen- Clusters.

Das Nukleogramm zeigt eine zusammenhängende dichte Punktwolke mit deutlicher Betonung der polymorphnukleären Zellen. Die Gerätemessung erscheint nach den internen Plausibilitätskontrollen (MCHC/ CHCM, LeukoB/ LeukoP) glaubhaft.

Trotzdem ist aufgrund der extremen Blutbildveränderungen und den nicht eindeutig von der Clusterung eingegrenzten Punktwolken in jedem Fall eine visuelle Nachkontrolle indiziert.

Im mikroskopischen Präparat bestätigt sich die starke Leukozytose nicht, die Leukozytenzahl dagegen erscheint normal bis mittelgradig erhöht. Es finden sich einige toxische Neutrophile Granulozyten, einige Monozyten und einige Stabkernige Neutrophile Granulozyten. Allerdings fallen neben vorwiegend normochrom-normozytären und vereinzelt polychromatischen Erythrozyten massenhaft hauptsächlich Oxyphile und zahlreiche Basophile Normoblasten mit deutlichen Zeichen der Dyserythropoese (fragmentierte Kerne, Reifungsdissoziation, deutlich sichtbare Kernkörperchen in Normoblasten) und einige Proerythroblasten auf. Die Anzahl der Thrombozyten erscheint normal, teilweise sind die Thrombozyten aktiviert oder liegen in Agglutinen vor. Vom zytologischen Bild besteht der Verdacht auf das Vorliegen eines Myelodysplastischen Syndroms (MDS- Er) oder einer Erythroleukämie (M6). Anhand einer Knochenmarksuntersuchung kann die Diagnose Myelodysplastisches Syndrom (MDS-Er) gestellt werden (MORITZ, 1999). Eine Untersuchung auf FeLV- AG verläuft positiv. Ca. 80 % der Katzen mit MDS zeigen einen positiven Leukosetest (MISCHKE, 2003).

Bei der Analyse dieser Probe liefert der ADVIA™ 120 trotz plausibler interner Kontrollen falsche Ergebnisse. Die Zytogramme führen in diesem Fall auch zu Fehlinterpretationen. Die kernhaltigen Vorstufen der Erythropoese werden sowohl im Peroxidasekanal, als auch im Basophilenkanal erfasst (s.a. Kap. 5.6.2.3) und erklären die Pseudoleukozytose. Warnsignale, die auf die Anwesenheit von kernhaltigen Vorstufen der Erythropoese hinweisen, sind in dieser Softwareversion unterdrückt. Dieses Beispiel verdeutlicht die Notwendigkeit der mikroskopischen Nachdifferenzierung, ohne die eine korrekte Diagnose nicht gestellt werden kann.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass mit Hilfe des Ergebnisreportes und der graphischen Darstellungen

- die Messung auf Plausibilität überprüft,
- bei Veränderungen des roten Blutbildes eine Charakterisierung einer Anämie vorgenommen,
- Thrombozytenagglutinate identifiziert,
- eine echte von einer Pseudothromobzytopenie unterschieden,
- eine Aussage über den Aktivierungsgrad der Thrombozyten getroffen,
- Veränderungen des weissen Blutbildes erkannt
- und bei neoplastischen Veränderungen wertvolle Hinweise auf die betroffenen Zellreihen geliefert werden.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Die Qualitätssicherung in der Veterinärhämatologie erfordert die Beachtung speziesspezifischer Besonderheiten von Blutzellen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Softwareadaptation und Evaluation des für Humanblut konzipierten Multiparameter- Hämatologiesystems ADVIA™ 120 für die Tierart Katze. Die Evaluation umfasst umfangreiche Studien zur Präzision und Richtigkeit, Untersuchungen zur Linearität, Verschleppung (Carry over), Blutalterung in Abhängigkeit von der Lagerungstemperatur und Antikoagulanzenvergleiche. Besondere Aufmerksamkeit wird der Thrombozytenanalytik und Blutzelldifferenzierung der Katze gewidmet. Die Evaluation mündet in der Markteinführung der Multi-Species-Software Version 1.1.07-MS (derzeit aktuelle Version 1.1.08-MS).

Der ADVIA™ 120 weist für die **Präzision innerhalb der Serie und über verschiedene Serien hinweg** mit Variationskoeffizienten zwischen 0,5 und 2,85 % für die Parameter der Blutzellzählung (WBC, RBC, HB, HCT, MCV, MCH, MCHC, CHCM, RDW, HDW, MPV) sehr gute Ergebnisse auf. Der Variationskoeffizient von 8,4 bzw. 6,2 % für den Parameter PLT ist mit Rücksicht auf die Speziesbesonderheit der Katze als gut, ein CV von 2,5 bzw. 2,25 % für den Parameter MPV sogar als sehr gut zu bewerten. Für die Parameter der Blutzelldifferenzierung können bei der Präzision innerhalb der Serie eine mäßige Präzision für die Neutrophilen Granulozyten mit einem CV von 12,1 %, eine gute Präzision mit einem CV von 2,6 % für die Lymphozyten und ein CV zwischen 23,2 % (Eosinophile Granulozyten) und 33,8 % (Basophile Granulozyten) für die zahlenmäßig im Blut weniger stark vertretenen Zellen ermittelt werden. Für die Monozyten fällt ein guter CV von 7,7 % auf. Der Variationskoeffizient beträgt für die absolute Retikulozytenzählung 9,4 %.

Bei der Überprüfung der **Linearität** werden mit einem Korrelationkoeffizienten von $r = 1,00$ ausgezeichnete Zusammenhänge für die Parameter RBC (Messbereich: $0,0 - 12,33 \times 10^{12} \text{ l}^{-1}$) und HB (Messbereich: $0,0 - 9,9 \text{ mmol l}^{-1}$) erzielt. Das Ergebnis des **Carry overs** liegt für den Parameter RBC mit einem Wert von 0,05 % deutlich unter dem geforderten Grenzbereich von 0,25 %. Für den Parameter HB ist keine Verschleppung nachweisbar.

Der **Methodenvergleich** zur Beurteilung der Richtigkeit ergibt für die Parameter WBC, RBC, HB, HCT, MCV und MCH in Softwareversion 4 (ADVIA™ 120/ H*1) exzellente Korrelationen von $r > 0,975$. Gute bis nur mäßige Korrelationen finden

sich mit Korrelationskoeffizienten von $r > 0,74$ für die Parameter HDW und PLT und von $r > 0,577$ für den Parameter MCHC. Für die Parameter MPV und PDW ergibt sich aufgrund methodischer Unterschiede eine schlechte Übereinstimmung. Für die Differenzierung der Neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten wird eine gute bis zufrieden stellende, für die Monozytendifferenzierung nur eine mäßige Korrelation nachgewiesen. Durch die Softwareadaptation wird eine Steigerung der Korrelation der Eosinophilendifferenzierung auf $r = 0,622$ erreicht. Die anhand von 30 Katzen überprüfte neue Messtechnik zur Erfassung der Eosinophilen Granulozyten im Retikulozytenkanal führt weiterhin zu einer Verbesserung der Korrelation auf $r > 0,800$. Für die Retikulozytenzählung sind akzeptable Korrelationen ($r = 0,697$) zwischen der manuellen und automatischen Messmethode zu verzeichnen.

Bei der Überprüfung des **Einflusses der Antikoagulanzen** K₃- EDTA, Li- Heparin und Citrat auf die Messergebnisse des ADVIATM 120 können für die Parameter WBC, RBC, HB, MCH und RETI keine signifikanten Unterschiede der Messwerte festgestellt werden. Für die Parameter MCV, RDW, PLT und MPV zeichnen sich für K₃- EDTA und Citrat bessere Ergebnisse ab.

Die Untersuchungen des **Einflusses der Lagerungstemperatur (4° C, 22° C) und der Lagerungsdauer (72 Stunden)** ergeben, dass sich die Parameter WBC, RBC und HB unabhängig von der Lagerungstemperatur und -dauer über 72 Stunden als sehr stabil erweisen. Bei den anderen Parametern der Blutzellzählung kann allgemein festgehalten werden, dass die Lagerungsdauer einen größeren Einfluss auf die Messergebnisse hat als die Lagerungstemperatur. Aus diesem Grund sollte die automatische Blutzellzählung und -differenzierung nach maximal 24 Stunden abgeschlossen sein.

Anhand von **Fallbeispielen** wird die Bedeutung der zahlreichen Histo- und Zytogramme demonstriert, die neben dem numerischen Datenreport ein wertvolles diagnostisches Instrument erythrozytärer, thrombozytärer und leukozytärer Veränderungen darstellen.

Zusammenfassend ist festzustellen dass der ADVIATM 120 mit seiner Multi-Species-Software ein sehr gutes Hämatologiesystem für die Blutzellanalytik der Katze darstellt.

9 SUMMARY

It is important to realize that certain properties of blood cells are closely related to the species of origin. This is especially true for quality assurance in veterinary hematology. The aim of this study is to evaluate the multi-parameter hematology system ADVIATM in the cat, a system originally designed for the examination of human blood, and to adapt its software for this purpose. The evaluation consists of extensive studies on its precision and accuracy, as well as linearity and carry-over studies, the analysis of blood ageing related to storage temperature, and anticoagulant assessment studies. Special attention is given to thrombocyte analysis and blood cell differentiation in the cat. The evaluation leads to the market launch of the multi-species software version 1.1.07-MS (current version is 1.1.08-MS).

A high **precision within single batches** and **between batches** is determined for the ADVIATM 120, with coefficients of variation (CV) ranging from 0.5 to 2.85 % for the blood cell count parameters (WBC, RBC, HB, HCT, MCV, MCH, MCHC, CHCM, RDW, HDW, MPV). A CV of 8.4 resp. 6.2 % for the parameter PLT indicates a good result in the cat, a CV of 2.5 resp. 2.25 % for the MPV parameter can be considered excellent. The precision of blood cell differentiation parameters within a batch can be seen as moderate for neutrophils with a CV of 12.1 % and good for lymphocytes (CV 2.6 %). The differentiation of blood cells appearing less frequently in the blood such as eosinophils and lymphocytes demonstrates CV's of 23.2% resp. 33.8%. The monocyte count shows a remarkably good CV of 7.7 %. The CV for the absolute reticulocyte count is 9.4%.

The assessment of **linearity** shows an excellent correlation for the parameters RBC (measuring range: $0.0 - 12.33 \times 10^{12} \text{ l}^{-1}$) and HB (measuring range: $0.0 - 9.9 \text{ mmol l}^{-1}$), with a coefficient of correlation of $r = 1.00$. At 0.05 %, the results of the **carry over** for the RBC are clearly below the minimum value of 0.25%. No carry-over is found for the parameter HB.

The accuracy of the results when **comparing the techniques** establishes excellent correlations of $r > 0.975$ for the parameters WBC, RBC, HB, HCT, MCV and MCH in the software version 4 (ADVIATM 120/ H*1). The parameters HDW and PLT resp. MCHC exhibit a good to only moderate correlation with coefficients of correlation of $r > 0.74$ resp. $r > 0.577$. Different techniques correlate poorly for the parameters MPV and PDW. The correlation for the differentiation of neutrophils and lymphocytes

is good to satisfactory; monocyte differentiation shows only a moderate correlation. Software adaptation increases the correlation of eosinophil differentiation to $r = 0.622$. The new technique of measuring eosinophils in the reticulocyte channel improves the correlation to a value of $r > 0.800$, as verified in measurements in 30 cats. An acceptable correlation of $r = 0.697$ is seen when comparing automatic and manual reticulocyte counts.

A study of the **influence of the anticoagulants** K₃- EDTA, Li- heparin and citrate on the measurement results of the ADVIATM 120 shows no significant difference for the parameters WBC, RBC, HB, MCH and RETI. Measurement results reveal better results with K₃- EDTA and citrate for the parameters MCV, RDW, PLT and MPV.

An analysis of the **influence of storage temperature (4° C, 22° C) and duration (72 hours)** reveal that the parameters WBC, RBC and HB are very stable independent of storage temperature and storage duration of more than 72 hours. In general, the examination of the other blood cell count parameters shows that storage duration has a greater impact on the measurement results than the storage temperature. For this reason, the automatic blood cell count and differentiation should be completed after a maximum of 24 hours.

Case studies are cited to demonstrate the significance of numerous histograms and cytograms which, apart from providing a numeric data report, represent a valuable diagnostic instrument for the determination of erythrocytic, thrombocytic and leukocytic abnormalities.

In conclusion, the ADVIATM 120 and its multi-species software represent a very good hematology system for the blood cell analysis of the cat.

10 LITERATURVERZEICHNIS

BACUS,J.W. (1973):

The observer error in peripheral blood cell classification.

Am.J.Clin.Pathol., 59, 223-230.

BARNETT,C.W. (1933):

The Unavoidable Error in the Differential Count of the Leucocytes of the Blood.

J.Clin.Invest., 77-85.

BENTLEY,S.A. (1990):

Qualitiy control and the differential leukocyte count.

Clin.Lab.Haemat., 12, 101-109.

BESCHLUSS DES VORSTANDES DER BUNDESÄRZTEKAMMER (1988):

Richtlinien der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien.

Lab.Med., 12, 43-60.

BOLLINGER,P.B.; DREWINKO,B.; BRAILAS,C.D.; SMEETON,N.A.; TRUJILLO,J.M. (1987):

The technicon H*1--an automated hematology analyzer for today and tomorrow. Complete blood count parameters.

Am.J.Clin.Path., 87, 71-78.

BOVERI,R.M. (1939):

The errors in the differential blood count.

Guy's Hospital reports, 89, 112-119.

BROCKHAUS ENZYKLOPÄDIE (1988):

Stichwort Evaluation.

Band 6, 677.

BROUGHTON,P.M.; GOWENLOCK,A.N.; MCCORMACK,J.J.; NEILL,D.W.A. (1974):
A Revised Scheme for the Evaluation of Automated Instruments for Use in Clinical
Chemistry.

Ann.Clin.Biochem., 11, 207-218.

BROWN,A.N.; BARSANTI,J.A. (1988):

Quantitative Buffy Coat Analysis for Hematologic Measurement of Canine, Feline and
Equine Blood Samples and for Detection of Microfilaremia in Dogs.

Am.J.Vet.Res., 49, 321-324.

BRUGNARA,C.; HIPPI,M.J.; IRVING,P.J.; LATHROP,H.; LEE,P.A.; MINCHELLO,E.;
WINKELMANN,J. (1994):

Automated Reticulocyte Counting and Measurement of Reticulocyte Cellular Indices.

Am.J.Clin.Pathol., 102, 623-632.

BRUGNARA,C.; RIVERA,A.; MINCHELLO,E.; DEANE,V. (1997):

ADVIA 120 Hematology System: Reticulocyte and Workflow Analysis.

Aus: Proceedings of the first International Bayer Diagnostics Central Laboratory
Symposium, 23-25.

BRUMMITT,D.R.; BARKER,H.F. (2000):

The determination of a reference range for new platelet parameters produced by the
Bayer ADVIA 120 full blood analyser.

Clin.Lab.Haematol., 22, 103-107.

BUTTARELLO,M.; BULIAN P; FARINA G.; PETRIS M.G.; TEMPORIN V.; TOFFOLO
L. (2002):

Five Fully Automated Methods for Performing Immature Reticulocyte Fraction.

Am.J.Clin.Pathol., 117, 871-879.

BUTTARELLO,M.; BULIAN P; FARINA G.; TEMPORIN V.; TOFFOLO L.;
TRABUSIO E.; RIZZOTTI P (2001):

Flow Cytometric Reticulocyte Counting.

Am.J.Clin.Pathol., 115, 100-111.

BUTTARELLO,M.; GADOTTI,M.; LORENZ,C.; TOFFALORI,E.; CESCHINI,N.;
VALENTINI,A.; RIZIOTTI,P. (1992):

Evaluation of four automated analyzers. A comparative study of differential counts
(imprecision and inaccuracy).

Am.J.Clin.Pathol., 97, 345-352.

CHAPMAN,E.S.; HETHERINGTON,E.J.; ZELMANOVIC,D. (1999):

A New View of Activated Platelets (Poster).

Blood, 10, No. 3437.

CLARK,P.; MOGG,T.; TVEDTEN,H.W.; KORCAL,D. (2002):

Artifactual Changes in Equine Blood Following Storage, Detected Usin the ADVIA
120 Hematology Analyser.

Vet.Clin.Path., 31, 90-94.

CRAMER,D.V.; LEWIS,R.M. (1972):

Reticulocyte response in the cat.

J.Am.Vet.Med.Assoc., 160, 61-67.

DAVIES,J.I.; SMYTH,M.S.; MARTIN,J.H. (1997):

Automated reticulocyte counting: evaluation of the Coulter STKS Haematology
Analyser reticulocyte counting function.

Clin.Lab.Haemat., 19, 89-92.

DAWSON,H.; HOFF,B.; GRIFT,E.; TVEDTEN,H.; SHOUKRI,M. (2000):

Validation of the Coulter Act Diff hematology Analyzer for Analysis of Blood of
Common Domestic Animals.

Vet.Clin.Path., 29, 132-136.

DEHWURST,E.C.; CRAWFORD,E.; CUE,E.; DODKIN,S.; GERMAN,A.J.;
PAPSOULIOTIS,K. (2003):

Analysis of canine and feline haemograms using the VetScan HMT analyser.

Journal of Small Animal Practice, 44, 443-448.

DIN 58931 (1995):

Bestimmung der Hämoglobinkonzentration im Blut, Referenzmethode.

Deutsches Institut für Normung e.V, 1-4.

DIN 58932-1 (1996):

Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Teil 1: Blutentnahme, Probenvorbereitung, Einflußgrößen, Störfaktoren.

Deutsches Institut für Normung e.V, 1-2.

DIN 58932-2 (1998):

Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Teil 2: Kennzeichnede Größen für Erythrozyten (Erythrozytenindices).

Deutsches Institut für Normung e.V, 1-2.

DIN 58932-3 (1994):

Bestimmung der Blutkörperchenkonzentration im Blut, Bestimmung der Konzentration der Erythrozyten, Referenzmethode.

Deutsches Institut für Normung e.V, 1-5.

DIN 58933-1 (1995):

Bestimmung des Volumenanteils der Erythrozyten im Blut, Teil 1: Zentrifugationsmethode als Referenzmethode.

Deutsches Institut für Normung e.V, 1-3.

DIN 58934-1 (1997):

Kontrollmaterialien für das Blutbild, Teil 1: Kontrollblute.

Deutsches Institut für Normung e.V, 1-3.

DORFMANN,D.M.; FITZPATRICK,P.A.; NIEVES,I.; WEINBERG,D.S.; WYBENGA,D.R. (1997):

ADVIA 120 Hematology System: Platelet Analysis.

In: Proceedings of the First International Bayer Diagnostic Central Laboratory Symposium, 45.

DÖRNER,K.; SCHULZE,S.; REINHARDT,M.A. (1993):

Erste Evaluationsergebnisse mit dem Hämatologiesystem Cell-Dyn 3500.

Klin.Lab., 39-44.

DOTSON,M.A. (1998):

Multiparameter Hematology Instruments.

In: Stiene-Martin, E. A., Lotspeich-Steininger, C. A. and Koepke, J. A.: Clinical Hematology, Lippincott, Philadelphia, 519-551.

D'ONOFRIO,G.; ZINI,G.; VERGINE,C.; DA RIN,G.; CHIRILLO,R. (1997):

New Parameters for Diagnosis and Management of Anemia.

In: Proceedings of the First International Bayer Diagnostic Central Laboratory Symposium, 14-16.

EDER,H.; FRITSCHKE,H. (1986):

Automatisation in der Hämatologischen Diagnostik: Entwicklungsstand der Geräte zum Zählen und Differenzieren von Blutzellen.

Tierärztl.Prax., 14, 417-429.

ENGLAND,J.M.; ROWAN,R.M.; VAN ASSENDELFT,O.W.; BULL,B.S.;
COULTER,W.H.; FUJIMOTO,K.; GRONER,W.; JONES,A.R.; KOEPKE,J.A.;
LEWIS,S.M.; SHINTON,N.K.; TATSUMI,N.; THOM,R.; VERWILGHEN,R.L.;
MCLAREN,C.E. (1994):

Guidelines for the Evaluation of Blood Cell Analysers Including Those Used for Differential Leucocyte and Reticulocyte Counting and Cell Marker Applications.

Clin.Lab.Haematol., 157-174.

FAIRBANKS,V.F. (1971):

Is the peripheral blood film reliable for the diagnosis of iron deficiency anemia.

Am.J.Clin.Path., 55, 447-451.

FISCHER,A.; LECHNER,J.; KRAFT,W.; HIRSCHBERGER,J. (1989):

Test eines zentrifugalen Hämatologiesystems für die Praxis.

Tierärztl.Prax., 17, 227-230.

FISCHER,G.; ZELMANOVIC,D.; SHAPIRO,P.; GREENBAUM,A.; KUNICKA,J.
(1997):

Evaluation of the Two-Dimensional Platelet Method on the ADVIA 120 Hematology System.

In: Proceedings of the First International Bayer Diagnostic Central Laboratory Symposium, 46.

GIGER,U.; KOHN,B. (1996):

Die anämische Katze: Ursachen und diagnostische Besonderheiten.

Proceedings BPT-Kongreß, 5.-8.9.1996, Nürnberg, 180-182.

GOLDNER,F.M.; MANN,W.N. (1938):

The statistical error or the differential white count.

Guy's Hospital reports, 88, 54-65.

GOOSSENS,W.; VAN,D.; VERWILGHEN,R.L. (1991a):

K2- or K3-EDTA: the anicoagulans of choice in routine haematology.

Clin.Lab.Haematol., 13, 291-295.

GOOSSENS,W.; VAN-HOVE,L.; VERWILGHEN,R.L. (1991b):

Monocyte counting: Discrepancies in results obtained with different automated instruments.

J.Clin.Path., 44, 224-227.

GOWENLOCK,A.H. (1969):

The Influence of Accuracy and Precision on the Normal Range.

Ann.Clin.Biochem., 6, 3-5.

GRENN,H.H.; ATKINSON,S.M.; CARLOS,B.; SOBOL,B. (1976):

Investigational studies of selected hematological parameters in fresh and mailed blood of six species of domestic animals.

Can.Vet.Jour., 17, 213-215.

GULATI,G.L.; ASSELTA A.; CHEN C. (1997):

Using a vortex to disaggregate platelet clumps.

Lab.Med., 28, 665-667.

HALLMANN,L. (1980):

Klinische Chemie und Mikroskopie.

Georg- Thieme- Verlag, Stuttgart, New York

HART,S.; NOLTE,I. (1991):

Zur Thrombozytenaggregation bei der Katze.

Tierärztl.Prax., 19, 413-418.

HOFMANN-LEHMANN,R.; WEGMANN,D.; WINKLER,G.C.; LUTZ,H. (1998):

Evaluation of the QBC-Vet Autoread haematology system for domestic and pet animal species.

Comparative Haematology International, 8, 108-116.

ICSH (1978):

Protocol for Type Testing Equipment and Apparatus Used for Haematological Analysis.

J.Clin.Path., 275-279.

ICSH (1984):

Protocol for evaluation of automated blood cell counters.

Clin.Lab.Haemat., 6, 69-84.

ICSH (1987):

Recommendations for Reference Method for Haemoglobinometry in Human Blood (ICSH Standard 1986) and Specifications for International Haemiglobincyanide Reference Preparation (3rd Edition).

Clin.Lab.Haematol., 9, 73-79.

ICSH (1988):

Recommended Methods for the Visual Determination of White Cell and Platelet Counts.

WHO/LAB, 88.3.

ICSH (1992):

ICSH Guidelines for Reticulocyte Counting by Microscopy on Supravital Stained Preparations.

WHO/LBS, 92.3.

JAIN,N.C. (1968):

Peroxidase Activity in Leucocytes of Some Animal Species.

Folia Haematol., 88, 297-304.

JAIN,N.C. (1970):

A Comparative Study of Leucocytes of Some Animal Species.

Folia Haematol., 94, 49-63.

JAIN,N.C. (1993):

Essentials of Veterinary Hematology.

Lea.& Febiger, Philadelphia.

KARPATKIN,S. (1978):

Heterogeneity of human platelets.

Blood, VI., 307-315.

KELLER,P. (1986):

Die Beurteilung hämatologischer Befunde bei Hund und Katze: Möglichkeiten zur Objektivierung und Interpretation von Laborresultaten im Hinblick auf Diagnose, Prognose und Therapie.

Schweiz Arch Tierheilkd, 128, 121-139.

KELTON,J.G. (1986):

Heparin-Induced Thrombocytopenia.

Haemostasis, 16, 173-186.

KILLINGSWORTH,C.R.; WEISS,D.J.; EYSTER,E.; BARTLETT,P.C.; BELL,T.G. (1985):

Screening coagulation tests in the cat: Reference values based on direct venipuncture and catheterized samples.

Vet-Clin-Path., 14, 19-23.

KIM,Y.R.; ORNSTEIN,L. (1983):

Isovolmetric Sphering of Erythrocyte for More Accurate and Precise Cell Volume Measurement by Flow Cytometry.

Cytometry., 3, 419-427.

KLINGLER,K. (1997):

ADVIA 120 Hematology System: Analytical Performance.

In: Proceedings of the First International Bayer Diagnostic Central Laboratory Symposium, 26-28.

KOEPKE,J.A. (1985):

Rationale for the NCCLS Standard H20-T for Differential Leucocyte Counting.

Blood Cells., 11, 161-171.

KOEPKE,J.A.; DOTSON,M.A.; SHIFMAN,M.A. (1985):

A Critical Evaluation of the Manual/Visual Differential Leukocyte Counting Method.

Blood Cells., 11, 173-181.

KOEPKE,J.A.; ROSS,D.W.A. (1985):

White Blood Cell Differential: A Call for Standards.

Blood Cells ., 1-9.

KOSANKE,W. (1999):

Lasersteulicht und Peroxidasefärbung als Grundlagen zur Erstellung des Blutbildes und der Retikulozytenanalytik.

In: Bruhn, H. D. and Fölsch, U. R.: Lehrbuch der Labormedizin, Schattauer Verlag, Stuttgart, 403-410.

KRAFT,W.; DÜRR,U.M. (1999):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin.

Schattauer Verlag, Stuttgart

KRAFT,W.; GERBIG,T.; GEYER,S. (1980):

Thrombozytopenie bei Feliner Infektiöser Panleukopenie.

Kleintierpraxis, 25, 129-134.

KUNICKA,J.E.; FISCHER,G.; MURPHY,J.; ZELMANOVIC,D. (2000):

Improved Platelet Counting Using Two-Dimensional Laser Light Scatter.

Am.J.Clin.Path., 114, 283-289.

LEWIS,S.M. (1990):

Standardization and Harmonization of the Blood Count: The Role of the International Committee for Standardization in Haematology (ICSH).

Eur.J.Haematol.Suppl., 45, 9-13.

LIEDL,R.; HIRSCHBERGER,J. (1997):

Automatische Zellzählung und Zelldifferenzierung mit dem Technicon H*1 bei Blutproben der Katze.

Kleintierpraxis, 42, 703-708.

LOMBARTS,A.J.P.F.; DEKIEVIET,W.A. (1988):

Recognition and Prevention and Concomitant Pseudoleukocytosis.

Am.J.Clin.Path., 634-639.

MACEY,M.; AZAM,U.; MCCARTHY,D.; WEBB,L.; CHAPMAN,E.S.; OKRONGLY,D.; ZELMANOVIC,D.; NEWLAND,A. (2002):

Evaluation of the Anticoagulants EDTA and Citrate, Theophyllin, Adenosine and Dipyridamole (CTAD) for assessing Platelet Activation on the ADVIA 120 Hematology System.

Clin.Chem., 48, 891-899.

MACEY,M.G.; CARTY,E.; CHAPMAN,E.S.; ZELMANOVIC,D.; OKRONGLY,D.;
RAMPTON,D.S.; NEWLAND,A.C. (1999):

Use of Mean Platelet Component to Measure Platelet Activation on the ADVIA 120
Hematology System.

Cytom., 1-7.

MEISTER,D.; TSCHUDI,P.; HERMANN,M.; LUTZ,H. (1990):

Erfahrungen mit dem QBC-V Hämatologiesystem an den Tierspitälern Zürich und
Bern.

Schweiz.Arch.Tierheilk., 132, 261-266.

MERCK (1990a):

Färbearbeitung für MERCK-Leucognost POX-Färbung.

MERCK (1990b):

Färbearbeitung für MERCK-Leucognost EST-Färbung.

MISCHKE,R. (2003):

Praktische Hämatologie bei Hund und Katze.

Schlütersche, Hannover

MISCHKE,R.; DENITZ,A.; WEISS,J. (1995):

Untersuchung zur Automatischen Zellzählung aus Katzenblut.

Dt.Tierärztl.Wschr., 102, 419-454.

MORITZ,A. (1999):

Knochenmarkuntersuchung.

In: Kraft, W. and Dürr, U. M.: Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin,
Schattauer Verlag, Stuttgart, 78-86.

MORITZ,A. (2000):

Der Einsatz lasergestützter Multiparameter- Hämatologiesysteme in der Veterinärmedizin.

Büchse der Pandora; Verlagsausgabe; ISBN 3-88178-169-2.

MORITZ,A.; FICKENSCHER,Y.; MEYER,K.; FAILING,K.; WEISS,D.J. (2004):

Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system.

Vet.Clin.Path., 33, 32-38.

MORITZ,A.; HOFFMANN,C. (1997):

Thrombozytenzählung bei der Katze.

Tierärztl.Prax., Ausgabe K, Kleintiere und Heimtiere, 25, 695-700.

MORITZ,A.; HOFFMANN,C.; SEEGER,S,M.; ZIEGLER,A.; FAILING,K. (1995):

Die Automatisierte Blutzellendifferenzierung mit dem Hämatologiesystem Technicon H*1.

Kongreßband 41.Jahrestagung der FG Kleintierkrankheiten der DVG, München, 1-18.

MORITZ,A.; WALCHECK,B.K.; WEISS,D.J. (2003):

Flow Cytometric Detection of Activated Platelets in the dog.

Vet.Clin.Path., 32, 6-12.

MORITZ,A.; WALCHECK,B.K.; WEISS,D.J. (2005):

Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease.

Am.J.Vet.Res., 66, 325-329.

NCCLS (1992):

Reference Leucocyte Differential Count (Proportional) and Evaluation of Instrumental Methods. Approved Standard.

NCCLS.Document., H20.-A.

NEUERER,F.; HIRSCHBERGER,J. (1999):

Evaluation des Hämatologiegerätes Vet ABC/8P bei Hund, Katze und Pferd.
Prak.Tierarzt., 80, 584-594.

ORNSTEIN,L.; ANSLEY,H.; SAUNDERS,A.A. (1976):

Improving Manual Differential White Cell Counts with Cytochemistry.
Blood Cells., 557-585.

PERKINS,P.; GRINDEM,C.B. (1995):

Evaluation of Six Cytometric Methods for Reticulocyte Enumeration and
Differentiation in the Cat.
Vet.Clin.Path., 24, 37-43.

PFEIL,R.; GENSCHOW,E. (1987):

Untersuchungen zur elektronischen Thrombozytenzählung bei Hund und Katze.
Kleintierpraxis, 32, 119-122.

REAGAN,W.J.; VAP,L.M.; WEISER,M.G. (1992):

Flow Cytometric Analysis of Feline Reticulocytes.
Vet.Path., 29, 503-508.

ROSIER,H.; VAUPEL,H.A.; KÖRBER,W.; SALVIC,J.; KELLER,R.A. (1993):

Erfahrungen mit dem Cell-Dyn 3000 ein Gerät zur Mechanisierten Erstellung des
Roten und Weißen Blutbilds.
Lab.Med., 47-57.

ROSS,D.W.; KAPLOW,L.S.A. (1985):

Myeloperoxidase Deficiency.
Arch.Path.Lab.Med., 1005-1006.

ROWAN,R.M.; ENGLAND,J.M. (1993):

Special Aspects in Haematology.

In: Haeckel, R.: Evaluation Methods in Laboratory Medicine, VCH, Weinheim, 141-150.

RÜMKE,C.L. (1960):

Die Zelldifferenzierung in Blutausstrichen: Variabilität der Ergebnisse.
Triangle., 4, 154-158.

RÜMKE,C.L. (1977):

The Statisical Expected Variability in Differential Leucocyte Counting.
Aus.: Koepke., J.A.(ed) Differential.Leukocyte Counting., 45.

RÜMKE,C.L. (1985a):

Imprecision of Ratio-Derived Differential Leukocyte Counts.
Blood Cells., 11, 311-314.

RÜMKE,C.L. (1985b):

The Statistical Precision of WBC Differentials.
Blood Cells., 11, 145-147.

RÜMKE,C.L.; BEZEMER,P.D.; KUIK,D.J.A. (1975):

Normal Values and Least Significant Differences for Differential Leucocyte Counts.
J.Chron.Dis., 28, 661-668.

SACHS,L. (1992):

Angewandte Statistik, Anwendung Statistischer Methoden.
Springer Verlag

SAVAGE,R.A. (1984):

Pseudoleukocytosis Due to EDTA-induced Platelet Clumping.
Am.J.Clin.Path., 81, 317-322.

SAVAGE,R.A.; SKOOG,D.P.; RABINOVITCH,A. (1985):

Analytic inaccuracy and imprecision in reticulocyte counting: a preliminary report
from the College of American Pathologists Reticulocyte Project.
Blood Cells., 11, 97-112.

SCHULZ,B.; HARTMANN,K.; HIRSCHBERGER,J. (2001):

Hypereosinophiles Syndrom bei der Katze- Zwei Fälle.

Inlab 2001, 70-71.

SHINTON,N.K.; ENGLAND,J.M.; KENNEDY,D.A.A. (1982):

Guidelines for the Evaluation of Instruments Used in Haematology Laboratories.

J.Clin.Path., 35, 1095-1102.

SPÄTH,H.; WEBER,C. (1992):

Prüfung eines für die Humanmedizin entwickelten Hämatologie-Analysesystems auf Anwendbarkeit in der Veterinärmedizin.

Prak.Tierarzt., 11, 1037-1040.

STANWORTH,S.J.; DENTON,K.; MONTEATH,J.; PATTON,W.N. (1999):

Automated counting of platelets on the Bayer ADVIA (TM) 120 analyser.

Clin.Lab.Haematol., 21, 113-117.

STIENE-MARTIN,E.A. (1980):

Causes for Poor Leukocyte Distribution in Manual Spreader-Slide Blood Films.

Am.J.Med.Technol., 49, 624-632.

STIENE-MARTIN,E.A. (1998):

Instrumentation for Hematologic Evaluation.

In: Stiene-Martin, E. A., Lotspeich-Steininger, C. A. and Koepke, J. A.: Clinical Hematology, Lippincott, Philadelphia, 515-518.

SUCHFORT,C. (1998):

Die automatisierte Blutzellzählung und-differenzierung mit dem Technicon H*1 bei der Katze unter besonderer Berücksichtigung der Thrombozyten und der Erythrozytenmorphologie bei Anämien.

Vetmed Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

SWAIM,W.R. (1991):

Laboratory and Clinical Evaluation of White Blood Cell Differential Counts.

Am.J.Clin.Pathol., 95, 381-388.

THOMAS,L.; MÜLLER TH.; RODRIAN J. (1989):

Vergleich der Bestimmung von Leukozytenpopulationen am Technicon H*1 mit der mikroskopischen Differenzierung.

Lab.Med., 13, 213-219.

THOMPSON,C.B.; DIAZ,D.; QUINN,P.G.; LAPINS,M.; KURTZ,S.R.; VALERI,C.R. (1983):

The role of anticoagulation in the measurement of platelet volumes.

Am.J.Clin.Path., 80, 327-332.

TVEDTEN,H. (1993a):

Advanced Hematology Analyzers Interpretation of Results.

Vet.Clin.Pathol., 22, 72-80.

TVEDTEN,H. (1993b):

H*1 Multi- Species Hematology System Overview.

In: Multispecies Hematology Atlas Technicon H*1-System, Bayer Diagnostics, Miles Inc., Tarrytown, NY, 6-11.

TVEDTEN,H. (1993c):

Leukocyte aggregates and feline platelet clumping,

In: Multispecies Hematology Atlas Technicon H*1-System, Bayer Diagnostics, Miles Inc., Tarrytown, NY.

130-131.

TVEDTEN,H. (1999):

General Laboratory Concepts.

In: Willard, M. D., Tvedten, H. and Turnwald, G. H.: Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods, Saunders, Philadelphia, 1-10.

TVEDTEN,H.; GRABSKI,S.; FRAME,L. (1988):

Estimating platelets and leukocytes on canine blood samples.

Vet.Clin.Path., 17, 4-6.

TVEDTEN,H.; HAINES,C. (1994):

Canine automated differential leukocyte count: study using a hematology analyzer system.

Vet.Clin.Path., 10, 90-96.

TVEDTEN,H.; KORCAL,D. (1996):

Automated differential leukocyte count in horses, cattle, and cats using the Technicon H-1E hematology system.

Vet.Clin.Path., 6, 14-22.

TVEDTEN,H.; KORCAL,D. (2001):

Vortex Mixing of Feline Blood to Disaggregate Platelet Clumps.

Vet-Clin-Path., 104-106.

TVEDTEN,H.W. (1981):

Hematology of the normal dog and cat.

Vet.Clin.North.Am.Small.Anim.Pract., 11, 209-217.

TVEDTEN,H.W.; KORCAL,D.; CLARK,P. (2002):

Erythrocyte ghost cells and pseudothrombocytosis with the Advia 120.

Oral Pres 29, ESVCP 2001,

TVEDTEN,H.W.; WILKINS,R. (1988):

Automated Blood Cell Counting Systems: A comparison of the Coulter S-Plus VI, Ortho Elt-8/DS, Ortho ELT-8/WS, Technicon H*1 and Sysmex E-5000.

Vet.Clin.Path., 17, 47-54.

TYCKO,D.H.; METZ,M.H.; EPSTEIN,E.A.; GRINBAUM,A. (1985):

Flow-Cytometric Light Scattering Measurement of Red Blood Cell Volume and Hemoglobin Concentration.

Appl.Optics., 24, 1355-1365.

VAN DE BOSSCHE, J.; DEVREESE, K.; MALFAIT, R.; VAN DE VYVERE, M.;
WAUTERS, A.; NEELS, H.; DE SCHOUWER, P. (2002):

Reference Interval for a Complete Blood Count Determined on different Automated
Haematology Analysers: Abx Pentra 120 Retic, Coulter Gen-S, Sysmex SE 9500,
Abbott Cell Dyn 4000 and Bayer ADVIA 120.

Clin.Chem.Lab.Med., 40, 69-73.

VON RÜCKER, A.; HENKEL, E.; HAECKEL, R.; DIEM, H.; GUNZER, H.;
MÜLLER, H.A.G.; NEBE, T.; WEBER, R.; JÖNSSON, D.; HELLER, S.;
BRÜGGEMANN, M.; FINK, P.; KALOUS, J.; KATZ, N.; KUTZNER, M.; LENZ, T.;
LIPS, H.; MÜLLER, W.; PICK, K.H.; PINTO, G.; PROHASKA, W.; RAFFAEL, A.;
REINECKE, T.; ROTHE, G.; RUBY, C.; SACHSE, C.; SEEGER, H.T.; SCHMITZ, G.;
SCHNEIDER, W.; STOBRAWA, F.; VAN WERSCH, J.W.J.; ZIERVOGEL, H. (1994):

Evaluationsprotokoll für hämatologische Zellzähl- und Zelldifferenzierungsgeräte.

Klinische Chemie Mitteilungen, 25, 272-286.

WEBER, R. (1992):

Meßprinzipien in der Hämatologie.

MTA Extra, 16, 4-24.

WEGMANN, D.; HOFMANN, L.R.; LUTZ, H. (1997):

Kurzevaluation des QBC-Vet Autoread Systems.

Tierärztl.Prax., 25, 185-191.

WEISER, M.G. (1982):

Erythrocyte Volume Distribution Analysis in Healthy Dogs, Cats, Horses and Dairy
Cows.

Am.J.Vet.Res., 163-166.

WEISER, M.G. (1983):

Comparison of Two Automated Multi-Channel Blood Cell Counting Systems for
Analysis of Blood of Common Domestic Animals.

Vet.Clin.Path., 25-32.

WEISER, M.G. (1995):

Erythrocyte responses and disorders.

In: Ettinger, S. J. and Feldmann: Textbook of veterinary internal medicine, 1864-
1891.

WEISER,M.G.; KOCIBA,G.J. (1983):

Sequential Changes in Erythrocyte Volume Distribution and Microcytosis Associated with Iron Deficiency in Kittens.

Vet.Path., 20, 1-12.

WEISER,M.G.; KOCIBA,G.J. (1984):

Platelet concentration and platelet volume distribution in healthy cats.

Am.J.Vet.Res., 45, 518-522.

WEISS,D.J. (1984):

Uniform Evaluation and Semiquantitative Reporting of Hematologic Data in Veterinary Laboratories.

Vet.Clin.Path., 13, 27-31.

WENZ,B.; RAMIREZ,M.A.; BURNS,E.R. (1987):

The H*1 hematology analyzer: Its performance characteristics and value in the diagnosis of infectious disease.

Arch.Path.Lab.Med., 111, 521-524.

WESTGARD,J.O.; CAREY,R.N.; WOLD,S. (1974):

Criteria for Judging Precision and Accuracy in Method Development and Evaluation.

Clin.Chem., 20, 825-833.

WIRTH,D. (1950):

Grundlagen der Klinischen Hämatologie der Haustiere.

Urban und Schwarzenberg

ZELMANOVIC,D.; GARCIA,R.A.; TURRELL,J. (1992):

Automated Instrumentation (Haematology).

In: Kirk and Othmer: Encyclopedia of Chemical Technology,

ZELMANOVIC,D.; HETHERINGTON,E.J. (1998):

Automated Analysis of Feline Platelets in Whole Blood, Including Platelet Count, Mean Platelet Volume and Activation State.

Vet.Clin.Path., 27, 2-9.

11 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. E.-G. Grünbaum danke ich für die Überlassung des Themas und die wertvollen Hinweise bei der Durchführung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn HDoz. Dr. Andreas Moritz für seine uneingeschränkte fachliche und menschliche Unterstützung. Seine Motivation und sein Vertrauen haben entscheidend zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz herzlicher Dank geht an Herrn Dr. K. Failing, Herrn Horst Heiter und die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Biomathematik für die sorgfältige Aufbereitung der umfangreichen statistischen Daten.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitarbeiterinnen im Labor der Klinik für Kleintiere für die Hilfe und Unterstützung der umfangreichen Laborarbeiten bedanken.

Danken möchte ich auch meinen Kollegen Y. Fickenscher, A. Gellert, M. Holsteg und M. Püsch der Arbeitsgruppe Hämatologie für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit.

In gleicher Weise gilt mein Dank auch allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere. Ein ganz besonderer Dank geht an Eva und Andreas Kirsch für ihre Freundschaft und tatkräftige Mithilfe bei der Entnahme der Blutproben.

Den Mitarbeitern der Firma Bayer, insbesondere Herrn Dipl. Ing. W. Kosanke, Herrn, Herrn Schraml und Herrn Eiler danke ich für die fundierte fachliche und technische Unterstützung.

Ganz herzlich danken möchte ich Stefan Bingel für die wertvolle Hilfe bei allen computertechnischen Fragen, Christine Bingel und Matthias Meyer für die stete Hilfe und moralische Unterstützung und nicht zuletzt Urs Christian Nees, der mir immer zur Seite stand.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, denn ohne ihre liebevolle Unterstützung wäre die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-89687-336-9

